

# **Untersuchung zur Maturation der Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase NirS aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tristan Nicke

aus Herford

1. Referentin: Privatdozentin Dr. Gunhild Layer

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 08.05.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 01.07.2013

Druckjahr 2013

# Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

Nicke, T., Schnitzer, T., Münch, K., Adamczack, J., Haufschildt, K., Buchmeier, S., Kucklick, M., Riedel, K., Felgenträger, U., Jänsch, L. & Layer, G. (2013). Maturation of the cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase NirS from *Pseudomonas aeruginosa* requires transient interactions between the three proteins NirS, NirN and NirF. *Biosci Rep*, **33**, e00048.

## Tagungsbeiträge

Nicke, T., Walther, J. M., Storbeck, S. & Layer, G.: Heme *d*<sub>1</sub> biosynthesis. (Vortrag) Tetrapyrrol-Retreat 2011, Bochum, Deutschland (2011).

Nicke, T. & Layer, G.: Insertion of tetrapyrrole cofactors into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. (Vortrag) PROTRAIN-Retreat 2011, Warberg, Deutschland (2011).

Nicke, T. & Layer, G.: Insertion of tetrapyrrole cofactors into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. (Vortrag) International Workshop „Prosthetic groups transport and insertion“ PROTRAIN, Warberg, Deutschland (2011).

Nicke, T., Schnitzer, T. & Layer, G.: TP5 - Insertion of tetrapyrrole cofactors into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. (Vortrag präsentiert von G. Layer) PROTRAIN-Begutachtung der DFG, Braunschweig, Deutschland (2012).

Nicke, T., Schnitzer, T. & Layer, G.: TP5 - Insertion of tetrapyrrole cofactors into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. (Poster) PROTRAIN-Begutachtung der DFG, Braunschweig, Deutschland (2012).

Nicke, T., Schnitzer, T., Buchmeier, S., Kucklick, M., Jänsch, L., Jockusch, B. M. & Layer, G.: Heme *d*<sub>1</sub> transport and insertion into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. (Vortrag) 7<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phtalocyanines (ICPP-7), Jeju, Südkorea (2012).

Nicke, T., Schnitzer, T., Buchmeier, S., Kucklick, M., Jänsch, L., Jockusch, B. M. & Layer, G.: Transport and insertion of heme *d*<sub>1</sub> into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. (Poster) GRC - Chemistry and Biology of Tetrapyrroles 2012, Salve Regina University, Newport, RI, USA (2012).

Nicke, T. & Layer, G.: Methoden zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. (Vortrag) Tetrapyrrol-Retreat 2013, Braunschweig, Deutschland (2013).

Nicke, T., Adamczack, J., Schnitzer, T., Buchmeier, S., Jänsch, L., Jockusch, B. M. & Layer, G.: Heme *d*<sub>1</sub> biosynthesis and insertion into cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. (Poster) VAAM Jahrestagung, Bremen, Deutschland (2013).



„Wo alle dasselbe denken, wird nicht viel gedacht.“

*Karl Valentin*



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 Mikrobielle Energiegewinnung unter anaeroben Lebensbedingungen</b>	<b>2</b>
1.2.1 Fermentation	3
1.2.2 Denitrifikation	3
<b>1.3 Der periplasmatische Raum</b>	<b>5</b>
1.3.1 Proteine im Periplasma	6
1.3.2 Sekretionssysteme	6
1.3.2.1 Der Sec-Transportweg	7
1.3.2.2 Signalsequenzen für den periplasmatischen Export	8
1.3.3 Lipoproteinbiogenese	9
<b>1.4 Das <i>nir</i>-Operon in <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>10</b>
1.4.1 Die Cytochrom <i>cd</i> <sub>1</sub> Nitritreduktase NirS	11
1.4.2 Die Häm-Biosynthese und das Cytochrom <i>c</i> Maturationssystem	13
1.4.2.1 Die Bildung von Uroporphyrinogen III	13
1.4.2.2 Die Bildung von Häm	14
1.4.2.3 Das Cytochrom <i>c</i> Maturationssystem	15
1.4.3 Die <i>c</i> -Typ Cytochrome NirM und NirC	16
1.4.4 Die Häm <i>d</i> <sub>1</sub> -Biosynthese und die beteiligten Enzyme	17
1.4.4.1 Die Häm <i>d</i> <sub>1</sub> -Biosynthese	17
1.4.4.2 Die Methyltransferase NirE	18
1.4.4.3 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDLGH	19
1.4.4.4 Das Eisen-Schwefel-Protein NirJ	20

1.4.4.5	Die potentielle Dehydrogenase NirF . . . . .	20
1.4.5	Der Häm $d_1$ -Einbau und das $c$ -Typ Cytochrom NirN . . . . .	21
1.4.5.1	Die Maturation der Nitritreduktase . . . . .	22
1.5	<b>Zielsetzung</b> . . . . .	23
2	<b>Materialien und Methoden</b>	25
2.1	<b>Geräte, Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel</b> . . . . .	25
2.1.1	Geräte . . . . .	25
2.1.2	Chemikalien und Enzyme . . . . .	27
2.1.3	Hilfsmittel . . . . .	28
2.2	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b> . . . . .	29
2.2.1	Bakterienstämme . . . . .	29
2.2.2	Plasmide . . . . .	30
2.2.3	Oligonukleotide . . . . .	31
2.3	<b>Medien und Medienzusätze</b> . . . . .	32
2.3.1	Medien . . . . .	32
2.3.1.1	LB-Medium . . . . .	32
2.3.1.2	TB-Medium . . . . .	32
2.3.1.3	Autoinduzierendes Medium . . . . .	32
2.3.1.4	AC-Medium . . . . .	34
2.3.2	Medienzusätze . . . . .	34
2.4	<b>Mikrobiologische Techniken</b> . . . . .	35
2.4.1	Sterilisation . . . . .	35
2.4.2	Bakterienkultivierung . . . . .	35
2.4.3	Bestimmung der Zelldichte . . . . .	36
2.4.4	Lagerung von Bakterien . . . . .	36
2.5	<b>Molekularbiologische Techniken</b> . . . . .	36
2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	36
2.5.2	Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen . . . . .	37
2.5.2.1	Erzeugung von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	37
2.5.2.2	Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	37
2.5.2.3	Erzeugung von elektrokompenten <i>P. aeruginosa</i> -Zellen . . . . .	37
2.5.2.4	Elektroporation von <i>P. aeruginosa</i> -Zellen . . . . .	38
2.5.3	Biparentales Mating . . . . .	38

2.5.4	DNA-Sequenzierung . . . . .	39
2.5.5	DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	39
2.5.6	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion . . . . .	39
2.5.7	Kolonie-Polymerasekettenreaktion . . . . .	41
2.5.8	Einführung von Punktmutationen mittels ortsspezifischer Mutagenese .	41
2.5.9	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	42
2.5.10	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese . . .	42
2.5.11	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	43
2.5.12	Ligation von DNA . . . . .	43
2.5.12.1	Oligonukleotide als Insert für die Ligation . . . . .	43
<b>2.6</b>	<b>Bearbeitung von Zellmembranen . . . . .</b>	<b>44</b>
2.6.1	Herstellung eines zellfreien Extrakts zur Zellmembranpräparation . . . .	44
2.6.2	Gewinnung der Gesamtzellmembran . . . . .	44
2.6.3	Isopyknische Gradientenzentrifugation . . . . .	45
<b>2.7</b>	<b>Proteinbiochemische Techniken . . . . .</b>	<b>46</b>
2.7.1	Produktion der Zielproteine . . . . .	46
2.7.1.1	Produktion von holo-NirS . . . . .	46
2.7.1.2	Produktion von semi-apo-NirS . . . . .	46
2.7.1.3	Produktion von NirN . . . . .	47
2.7.1.4	Produktion von NirF . . . . .	47
2.7.2	Zellernte . . . . .	48
2.7.3	Periplasmatischer Aufschluss . . . . .	48
2.7.4	Aufschluss mittels French Press . . . . .	49
2.7.5	Aufschluss mittels Kugelmühle . . . . .	49
2.7.6	Aufschluss mittels Ultraschall . . . . .	50
2.7.7	Proteinreinigung . . . . .	50
2.7.7.1	Dialyse von zellfreiem Extrakt und Proteinfractionen . . . . .	50
2.7.7.2	Anionenaustauscherchromatographie . . . . .	51
2.7.7.3	Kationenaustauscherchromatographie . . . . .	52
2.7.7.4	Gelpermeationschromatographie . . . . .	53
2.7.7.5	Affinitätschromatographie mittels Strep-Tag . . . . .	54
2.7.8	Häm $d_1$ -Extraktion . . . . .	55
2.7.9	<i>In vivo</i> Protein-cross-linking . . . . .	55

<b>2.8 Proteincharakterisierungen</b>	56
2.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	56
2.8.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.8.3 Proteindetektion mittels Western-Blot	58
2.8.4 N-terminale Sequenzierung	60
2.8.5 Massenspektrometrie	61
2.8.6 UV/Vis-Spektroskopie	61
<b>2.9 Proteinkristallisation</b>	61
<b>2.10 Immunobiologische Methoden</b>	62
2.10.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper	62
2.10.2 Erzeugung monoklonaler Antikörper	62
<b>2.11 Interaktionsstudien</b>	63
2.11.1 Immunopräzipitation	63
2.11.2 Strep-Protein Interaktions-Experiment	64
2.11.3 Immunoaffinitätsreinigung	64
2.11.3.1 Präparation des Immunoaffinitätssäulenmaterials	64
2.11.3.2 Immunoaffinitätschromatographie	65
<b>2.12 Bioinformatische Methoden</b>	67
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Bioinformatische Analyse der Proteine NirF und NirN</b>	<b>68</b>
3.1.1 Analyse der Signalsequenz von NirF	68
3.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von NirS, NirN und NirF	70
3.1.3 Strukturmodelle von NirF und NirN	71
<b>3.2 NirF - ein Lipoprotein in der inneren Membran</b>	<b>73</b>
3.2.1 Komplementierung einer <i>P. aeruginosa nirF</i> -Deletionsmutante mit verschiedenen NirF-Konstrukten	73
3.2.2 Lokalisierung von NirF aus <i>P. aeruginosa</i>	75
<b>3.3 Proteinpräparation von NirF</b>	<b>79</b>
3.3.1 Konstrukte für die NirF-Präparation	79
3.3.2 Produktion von NirF	80
3.3.3 Strep-Tag-Affinitätschromatographie der NirF	80
<b>3.4 Proteinpräparation von NirS</b>	<b>81</b>
3.4.1 Konstrukte für die NirS-Präparation	82

---

3.4.1.1	Konstrukte für die NirS-Produktion in <i>E. coli</i> . . . . .	82
3.4.1.2	Konstrukte für die NirS-Produktion in <i>P. stutzeri</i> . . . . .	82
3.4.2	Produktion von NirS-Varianten . . . . .	82
3.4.2.1	Produktion von saNirS in <i>E. coli</i> . . . . .	82
3.4.2.2	Produktion von saNirS in <i>P. stutzeri</i> . . . . .	85
3.4.2.3	Produktion von hNirS in <i>P. stutzeri</i> . . . . .	85
3.4.2.4	Zellaufschluss . . . . .	86
3.4.3	Reinigung der holo-NirS . . . . .	86
3.4.3.1	Anreicherung mittels Anionenaustauscherchromatographie . .	86
3.4.3.2	Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie . . .	90
3.4.4	Reinigung der semi-apo-NirS . . . . .	93
3.4.5	Häm $d_1$ -Extraktion . . . . .	95
<b>3.5</b>	<b>Proteinpräparation von NirN</b> . . . . .	<b>97</b>
3.5.1	Konstrukte für die NirN-Präparation . . . . .	98
3.5.2	Produktion von NirN . . . . .	98
3.5.3	Strep-Tag-Affinitätschromatographie der NirN . . . . .	98
3.5.4	Reinigung von NirN in nativer Form . . . . .	100
3.5.5	Proteinkristallisation von NirN . . . . .	101
<b>3.6</b>	<b>Erzeugung von Antikörpern</b> . . . . .	<b>102</b>
3.6.1	Monoklonale Antikörper . . . . .	102
3.6.2	Polyklonale Antikörper . . . . .	105
<b>3.7</b>	<b>Detektion von NirS und NirN in <i>P. aeruginosa</i> zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten</b> . . . . .	<b>105</b>
<b>3.8</b>	<b>Interaktionsexperimente mit NirS, NirN und NirF</b> . . . . .	<b>106</b>
3.8.1	<i>In vitro</i> Interaktionsexperimente . . . . .	107
3.8.2	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien mittels Immunopräzipitation . . . . .	107
3.8.2.1	<i>In vivo</i> Protein-cross-linking . . . . .	108
3.8.2.2	Ko-Immunopräzipitation von NirN und NirS . . . . .	109
3.8.2.3	Ko-Immunopräzipitation von NirN und NirS in Abhängigkeit von NirF . . . . .	111
3.8.3	<i>Pull-down</i> -Analysen von NirF . . . . .	112
3.8.4	Immunoaffinitätschromatographie von NirS und NirN . . . . .	114
3.8.4.1	Präparation der Säulenmaterialien . . . . .	115

---

3.8.4.2	Reinigungen der Antigene . . . . .	115
3.8.4.3	Analyse der ko-gereinigten Interaktionspartner von NirN und NirS . . . . .	116
3.9	Die <i>nirN</i> -Deletion führt zu verändertem Häm $d_1$ -Gehalt in NirS . . . . .	119
3.10	Modell der NirS-Maturation im Periplasma . . . . .	123
4	Zusammenfassung	128
5	Summary	130
6	Ausblick	132
7	Literaturverzeichnis	133
A	Anhang	a
B	Danksagung	g



# Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
A <sub>x</sub>	Absorption bei X nm
Abb.	Abbildung
AC	Asparagin-Citrat
<i>ad</i>	lat. zu
AK	Antikörper
ALA	5-Aminolävulinsäure
Amp	Ampicillin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
αNirN AK	anti-NirN Antikörper
αNirS AK	anti-NirS Antikörper
APB	Alkalische Phosphatase Puffer
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAM	engl. <i>β-barrel protein assembly machinery</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indocylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c <sub>A</sub>	Anfangskonzentration
c <sub>E</sub>	Endkonzentration
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cm	Chloramphenicol
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
Δ	Deletionsmutante
ΔF	Deletion des <i>nirF</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
ΔN	Deletion des <i>nirN</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
ΔS	Deletion des <i>nirS</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
<i>D.s.</i>	Gen/ Protein aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>

dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alteri</i>
FA	Formaldehyd
fig.	engl. <i>figure</i>
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
fw	engl. <i>forward</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hNirS	holo-Form der Nitritreduktase NirS
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IVPLC	<i>in vivo</i> Protein-cross-linking
GPC	Gelpermeationschromatographie
Kan	Kanamycin
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar (1 kb = 1'000 bp)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1'000 Da)
LB	Luria Bertani
m	monoklonal
Mbp	Megabasenpaar (1 Mbp = 1'000'000 bp)
M <sub>r</sub>	relative molekulare Masse
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei X nm
p	polyklonal
<i>p.a.</i>	lat. <i>pro analysi</i>
<i>P.a.</i>	Gen/ Protein aus <i>P. aeruginosa</i>

PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PCS	engl. <i>Prescission cleavage site</i>
Pip	Piperacillin
P/P	„Puffer zu Pellet“-Verhältnis, Volumen Puffer in mL zu Nasszellgewicht des Bakterienpellets in g
p.s.i.	engl. <i>pounds per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	engl. <i>reverse</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
saNirS	semi-apo-Form der Nitritreduktase NirS
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sm <sup>r</sup>	Streptomycin-Resistenz
SV	Säulenvolumen
SPINE	Strep-Protein Interaktions-Experimente
SUMT	SAM-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase
TAE	Tris-Acetate-EDTA Puffer
Tab.	Tabelle
TB	engl. <i>terrific broth</i>
Tet	Tetracyclin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TMD	Trans-Membran-Domäne
TMM	engl. <i>trace metal mixture</i> ; Spurenelementlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
ZYM	engl. <i>Z-Amine Yeast Medium</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

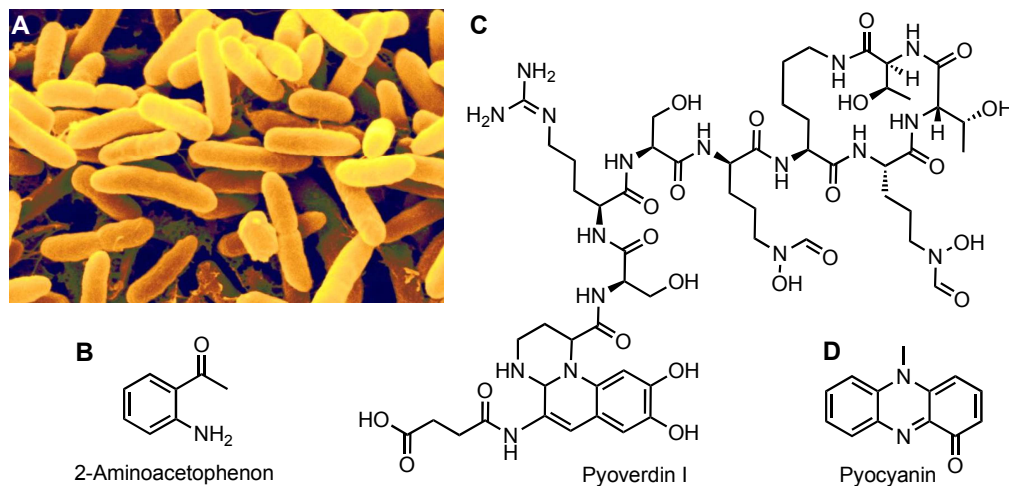
*Bacterium aeruginosum*, so lautete im Jahr 1872 der von Josef Schröter, aufgrund der Assoziation zu der Farbe von Grünspan, gewählte Name für *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter, 1872 und Skerman *et al.*, 1980). Die Einordnung in den Genus *Pseudomonas* erfolgte erst 28 Jahre später durch Walter Migula (Migula, 1900 und Skerman *et al.*, 1980). Es dauerte weitere 100 Jahre bis das 6.3 Mbp große Genom von *P. aeruginosa* vollständig sequenziert wurde (Stover *et al.*, 2000).

In der Zwischenzeit wurde das bis zu 4  $\mu\text{m}$  lange, stäbchenförmige, gramnegative Bakterium (Abb. 1.1 A) intensiv untersucht. Es zeigte sich, dass es vor allem in feuchten Milieus, wie Böden und Oberflächengewässern vorkommt. Darüber hinaus kann es auch aus Wasserleitungen, dort insbesondere aus Biofilmen, isoliert werden. In der heutigen Zeit ist *P. aeruginosa* hauptsächlich dafür bekannt, dass es ein opportunistisches Human-, Pflanzen- und Tierpathogen ist (Rahme *et al.*, 1995). Die hohe Resistenz gegenüber Antibiotika, vermittelt durch Genom codierte  $\beta$ -Laktamasen und Effluxpumpen (Winsor *et al.*, 2011 und Schweizer, 2003), erschweren die Behandlung, insbesondere von Kreuzinfektionen.

*P. aeruginosa* kann aufgrund seiner metabolischen Vielfalt sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Lebensbedingungen wachsen. Unter Sauerstoffausschluss ist es in der Lage zu denitrifizieren und Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Zumft, 1997). Darüber hinaus kann es auf Arginin- und Pyruvatfermentation zurückgreifen, sofern kein Sauerstoff zur Verfügung steht (Vander Wauven *et al.*, 1984 und Eschbach *et al.*, 2004).

Kulturen von *P. aeruginosa* fallen durch ihren süßlichen Geruch auf, der auf die Substanz 2-Acetophenon (Abb. 1.1 B) zurückzuführen ist (Mann, 1966). Infektionen mit *P. aeruginosa* zeigen häufig eine blau-grüne Färbung des Wundediters (ähnlich dem Grünspan), welche dabei hauptsächlich auf zwei sekretierte Moleküle zurückzuführen ist: Pyoverdin (Abb. 1.1 C), ein Siderophor, das unter anderem für die Virulenz essenziell ist (Meyer *et al.*, 1996) sowie

Pyocyanin (Abb. 1.1 D), das einen Farbstoff darstellt, der antimikrobielle Wirkung aufweist. Die Firma Sigma-Aldrich produziert diesen Farbstoff industriell in *P. aeruginosa*. Eine weitere biotechnologische Anwendung findet *P. aeruginosa* in der Produktion von Rhamnolipiden (Déziel *et al.*, 2003). Diese Substanzklasse gehören zu Biotensiden, die häufig besser biologisch abbaubar sind als chemisch hergestellte Tenside.



**Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas aeruginosa* und Strukturen von sekretierten Verbindungen.** Die Aufnahme A zeigt das Bakterium in seiner Stäbchenform (gelb) (www.visualphotos.com). 2-Aminoacetophenon (B) ist der Hauptgeruchsstoff von *P. aeruginosa*. Das in Struktur C gezeigte Molekül zeigt einen Typ von Pyoverdin I (Schalk, 2008), welches ein sekretiertes Siderophor von *P. aeruginosa* darstellt und für die Virulenz essenziell ist (Meyer *et al.*, 1996). Struktur D zeigt Pyocyanin, welches ein sekretiertes antimikrobielles Toxin und zugleich ein Farbstoff von *P. aeruginosa* ist.

## 1.2 Mikrobielle Energiegewinnung unter anaeroben Lebensbedingungen

*P. aeruginosa* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. Sofern Sauerstoff als bevorzugter Elektronenakzeptor fehlt, steht *P. aeruginosa* die Denitrifikation zur Verfügung bei der Nitrat und Nitrit als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden. Darüber hinaus kann *P. aeruginosa* Arginin und Pyruvat zur Energiegewinnung fermentieren.

### 1.2.1 Fermentation

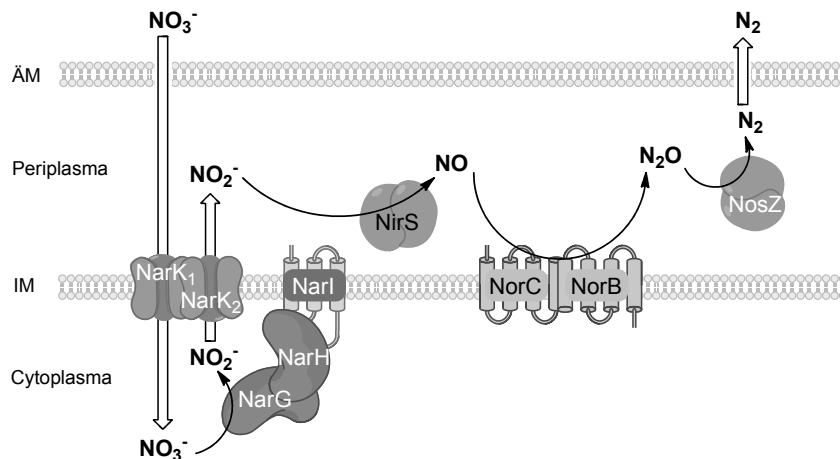
Die beiden Stoffwechselwege der Fermentation, über Arginin und Pyruvat, werden von *P. aeruginosa* genutzt, sofern weder Sauerstoff, noch Nitrat oder Nitrit zur Verfügung stehen. Die Pyruvatfermentation resultiert zwar nicht im Wachstum des Bakteriums, sichert jedoch das Überleben über einen längeren Zeitraum. Pyruvat wird im Zuge der Fermentation zu Acetat, Lactat oder Succinat umgesetzt (Eschbach *et al.*, 2004).

Die Argininfermentation führt zur Verstoffwechselung von Arginin zu Ornithin, Kohlenstoffdioxid und einem Ammoniumion. Im Gegensatz zur Pyruvatfermentation wird hierbei ein ATP pro Molekül Arginin erzeugt.

### 1.2.2 Denitrifikation

Die Denitrifikation (Abbildung 1.2) ist der effizienteste Weg für *P. aeruginosa* unter Sauerstoffmangel Energie zu gewinnen (Zumft, 1997). Die Denitrifikation stellt darüber hinaus einen wichtigen Teil des Stickstoffkreislaufs der Erde dar. Hierbei wird Nitrat schrittweise zu molekularem Stickstoff reduziert. Durch diesen Prozess wird der in Nitrat und Nitrit gebundene Stickstoff, vor allem aus Böden und Gewässern, der Atmosphäre zurückgeführt. Dabei dient Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor und wird zunächst zu Nitrit reduziert. Im Anschluss erfolgen die weiteren Reduktionen zu Stickstoffmonoxid, Distickstoffmonoxid bis hin zu elementarem Stickstoff. Technische Anwendung findet die Denitrifikation z. B. bei der Aufarbeitung von Abwässern in Kläranlagen.

Die Denitrifikation in *P. aeruginosa* stellt einen Prozess dar, der zu Beginn im Cytoplasma abläuft, dann aber im Periplasma fortgesetzt und beendet wird. Zunächst erfolgt die Aufnahme von Nitrat über einen Nitrat-Nitrit-Antiporter-Komplex ( $\text{NarK}_1\text{K}_2$ ). Hierbei wird im Gegenzug Nitrit ins Periplasma transportiert (Sharma *et al.*, 2006). Die genetischen Informationen für den Antiporterkomplex sowie den Proteinkomplex NarGHI sind im *narK<sub>1</sub>K<sub>2</sub>GHIJ*-Operon enthalten (Williams *et al.*, 2007). Der Proteinkomplex aus NarGHI stellt die Nitratreduktase dar, an der die Reduktion von Nitrat zu Nitrit erfolgt (Philippot & Højberg, 1999). Der Komplex enthält ein Membranprotein NarI, das einen Häm *b*-Kofaktor enthält. NarH ist ein membranassoziiertes Eisen-Schwefel-Protein mit einem  $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster, das zur Elektronenweiterleitung von NarI auf NarG dient. Letzteres ist ein cytoplasmatisches Molybdän-Kofaktor bindendes Protein, an dem die Reduktion von Nitrat abläuft. NarJ scheint an der Assemblierung des Nitratreduktasekomplexes beteiligt zu sein (Zumft, 1997).



**Abbildung 1.2: Schema der Denitrifikation und deren Lokalisation in *P. aeruginosa* (nach Zumft, 1997 und Steen, 2011).** ÄM steht dabei für die äußere und IM für die innere bakterielle Membran. NarK<sub>1</sub>K<sub>2</sub> sind am Transport von Nitrat und Nitrit über die innere Membran beteiligt. Die Proteine NarGHI bilden den Nitratreduktasekomplex. Die dimere Nitritreduktase NirS setzt NO<sub>2</sub><sup>-</sup> zu NO um. Die Membranporteeine NorBC katalysieren die Reaktion von NO zu N<sub>2</sub>O. Der letzte Schritt der Denitrifikation, die Erzeugung von N<sub>2</sub> aus N<sub>2</sub>O, wird durch die dimere N<sub>2</sub>O-Reduktase NosZ vollzogen.

*P. aeruginosa* besitzt darüber hinaus eine weitere, obgleich periplasmatische, Nitratreduktase, die durch das *napABCDEF*-Operon kodiert wird (Williams *et al.*, 2007). Hierbei ist NapABC der Reduktasekomplex, der im Gegensatz zu NarGHI jedoch nicht zum Aufbau des Protonengradienten beiträgt und somit keine Energie zur ATP-Synthese liefert (Van Alst *et al.*, 2009). Im zweiten Schritt der Denitrifikation kommt es im Periplasma zur Umsetzung von Nitrit zu Stickstoffmonoxid. Diese Reaktion wird von dem Enzym Nitritreduktase katalysiert. In den verschiedenen denitrifizierenden Bakterien findet man zwei unterschiedliche Typen der Nitritreduktase, entweder ein Kupfer-haltiges Enzym (NirK) oder die sogenannte Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase (NirS) (Zumft, 1997). *P. aeruginosa* enthält die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase NirS. Nähere Information zur Nitritreduktase NirS folgen im Kapitel 1.4.1.

Der NO-Reduktasekomplex NorBC enthält mehrere Kofaktoren, wobei ein Häm *b*, ein Häm *b*<sub>3</sub> und ein nicht-Häm-Eisen in NorB vorliegen. NorC besitzt im Gegensatz dazu ein kovalent gebundenes Häm *c*. Häm *b* und Häm *c* sind für den Elektronentransfer zuständig (Timóteo *et al.*, 2011). An der Umsetzung von NO zu N<sub>2</sub>O sind in NorB Häm *b*<sub>3</sub> und das nicht-Häm-Eisen beteiligt (Cordas *et al.*, 2013). Der genaue Mechanismus ist allerdings bislang nicht vollständig verstanden. Das *norBCD*-Gencluster kodiert darüber hinaus für NorD dessen Rolle nicht ausreichend geklärt ist. Bisher ist lediglich bekannt, dass es für das anaerobe Wachstum von *P. aeruginosa* bei der Nitratverstoffwechselung essenziell ist (Arai *et al.*, 1995)

Der letzte Schritt der Denitrifikation wird durch das dimere, periplasmatische Protein NosZ



katalysiert. Das dimere Polypeptid enthält zwölf Kupfer-Atome (Brown *et al.*, 2000), an denen die Bildung von Stickstoff aus Distickstoffmonoxid vollzogen wird. Sechs dieser Kupfer-Atome sind jeweils aufgeteilt auf ein Cu<sub>A</sub>-Zentrum (2 Cu) und ein Cu<sub>Z</sub>-Zentrum (4 Cu) pro Monomer (Zumft & Kroneck, 2007). NosZ ist im *nosRZDFYL*-Operon kodiert. NosR ist ein membran-gebundener Regulator für die NosZ Aktivität, wohingegen die Proteine NosDFY möglicherweise an der Biogenese der Cu<sub>Z</sub>-Zentren der N<sub>2</sub>O-Reduktase beteiligt sein könnten (Zumft & Kroneck, 2007). Die Bedeutung von NosL ist noch unklar, da eine Deletion von *nosL* zu keinem, bisher beobachteten, Phänotyp führt (Zumft & Kroneck, 2007).

Die Denitrifikation in *P. aeruginosa* wird sowohl durch die Konzentration von Sauerstoff, Stickstoffmonoxid und Nitrat reguliert sowie durch Signalmoleküle von Zell-Zell Kommunikationssystemen (Toyofuku *et al.*, 2012b). Bei einer geringen Sauerstoffkonzentration wird der Regulator ANR (*a*naerobic *r*egulation of *a*rginine *d*eiminase and *n*itrate *r*eduction) aktiviert. Dieser wiederum steigert die Transkription von *narXL* und dem *d*issimilatory *n*itrate *r*espiration *r*egulator-Gen (*dnr*). Das Zwei-Komponenten-System NarXL (NarX - Sensorkinase, NarL - Transkriptionsregulator) reagiert außerdem auf Nitrat und aktiviert zusammen mit ANR die Expression von *dnr*. DNR wird durch die Anwesenheit von NO aktiviert und induziert die Transkription der vier Reduktasen, wobei das *nar*-Operon zusätzlich von ANR und NarL reguliert wird (Arai *et al.*, 2003 und Schreiber *et al.*, 2007).

Darüber hinaus spielt die Zell-Zell Kommunikation eine wichtige Rolle bei der Regulation der Denitrifikationskaskade. Die *Quorum sensing*-Moleküle 3oC<sub>12</sub>-HSL (N-3-Oxododecanoyl-L-homoserinlacton) und C<sub>4</sub>-HSL (N-Butyryl-L-homoserinlacton) werden über die Rezeptoren LasR und RhlR detektiert und reprimieren die Produktion der Denitrifikationsproteine. Das *Pseudomonas quinolone signal*-Molekül (2-Heptyl-3-hydroxy-4-quinolon) aktiviert hingegen NirS und hemmt die Aktivitäten von NarGHI, NorBC und NosZ (Toyofuku *et al.*, 2012b).

## 1.3 Der periplasmatische Raum

Die Zelle eines gramnegativen Bakteriums ist durch zwei doppelschichtige Membranen in die zwei Kompartimente Cytoplasma und Periplasma unterteilt. Die innere Membran dient als Barriere für Ionen und ermöglicht somit eine unterschiedliche ionische Zusammensetzung von Cytoplasma und Periplasma. An der Membran führt dies bis hin zu unterschiedlichen ionischen Gradienten, die für die Energieerzeugung der Zelle benötigt werden. Die Barriere verhindert darüber hinaus einen unkontrollierten Austritt von cytoplasmatischen Proteinen

und Makromolekülen. Die äußere Membran schützt das Bakterium vor der extrazellulären Umgebung und besitzt einige Transportsysteme, z. B. zur Aufnahme von Nährstoffen.

Im Cytoplasma herrschen stärker reduzierende Bedingungen als im Periplasma. Daher erlangt das Periplasma eine enorme Bedeutung für Proteine, die Disulfidbrücken als Strukturmerkmale besitzen. Das Periplasma ist ferner sehr wichtig als schützendes Kompartiment. In *P. aeruginosa* gibt es z. B.  $\beta$ -Laktamasen, die in das Periplasma abgegeben werden und somit einen Schutz vor  $\beta$ -Laktam-Antibiotika darstellen.

### 1.3.1 Proteine im Periplasma

Wie bereits angedeutet, herrschen im Periplasma stärker oxidierende Bedingungen als im Zellinneren. Dies führt dazu, dass die Disulfidbrückenmaturation bei gramnegativen Bakterien in dieses Zellkompartiment verlagert ist (Berkmen *et al.*, 2006). Die für die Maturation von Disulfidbrücken wichtigen Oxidasen, wie DsbA, und Isomerasen, wie DsbC, werden in *P. aeruginosa* in das Periplasma sekretiert (Winsor *et al.*, 2011). Die Disulfidbrückenmaturation im Periplasma wird biotechnologisch für die rekombinante Produktion von Antikörperfragmenten im periplasmatischen Raum genutzt (Humphreys, 2006). Komplexe Chaperonsysteme (wie z. B. DegP) sorgen für eine Qualitätskontrolle der Proteinfaltung im Periplasma (Krojer *et al.*, 2008). Darüber hinaus befinden sich weitere Proteintypen wie Lipoproteine, die in der inneren oder äußeren Membran verankert sein können, mit ihren löslichen Domänen im Periplasma (Okuda & Tokuda, 2011). Große Teile der Denitrifikation laufen im Periplasma ab (Zumft, 1997).  $\beta$ -Faltblattfässer, die einen wichtigen Teil der äußeren Membran darstellen, werden im Periplasma vollständig gefaltet, zur äußeren Membran transportiert und dort durch das BAM-System ( *$\beta$ -barrel protein assembly machinery*) in die Membran integriert (Tokuda, 2009).

### 1.3.2 Sekretionssysteme

Die zwei wichtigsten Systeme in gramnegativen Bakterien wie *P. aeruginosa* zum Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma ins Periplasma sind das Sec- und das Tat-System. Während ersteres Proteine ungefaltet in den periplasmatischen Raum exportiert, werden auf dem Tat-Transportweg bereits im Cytoplasma gefaltete Proteine transloziert. Beide Systeme greifen dabei auf N-terminale Signalsequenzen der zu translozierenden Proteine zurück, die für diese Transportwege gut verstanden sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit *in silico* vorhergesagt werden können (Petersen *et al.*, 2011, Juncker *et al.*, 2003 und Bendtsen *et al.*, 2005).

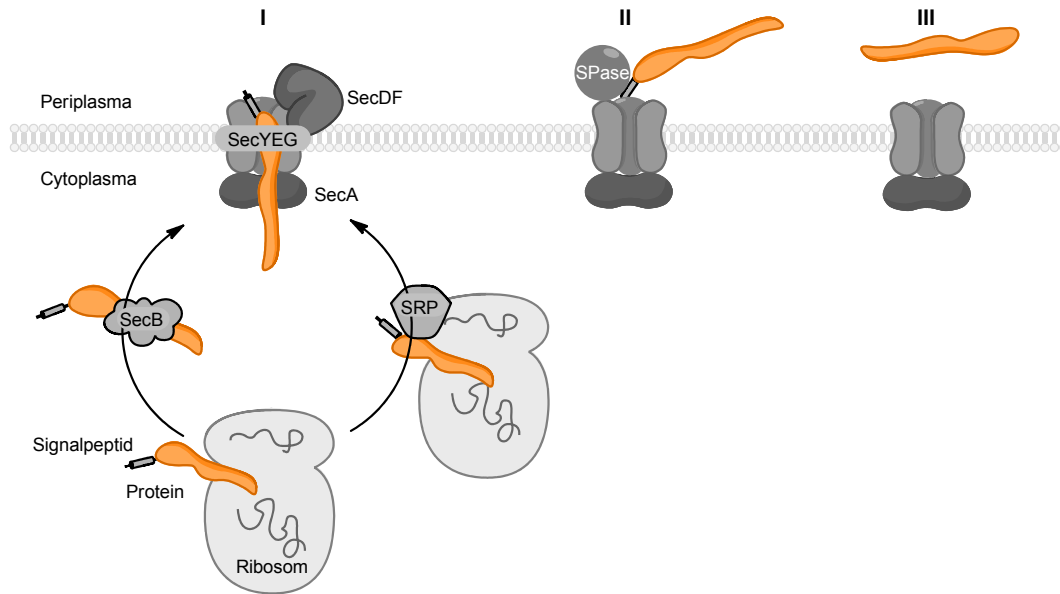
Dennoch gibt es große Unterschiede zwischen den N-terminalen Signalsequenzen. Das Tat-System greift hier auf ein weit gefasstes zRRxΦΦ Signal zurück. Dabei steht z für eine polare und Φ für hydrophobe Aminosäuren (x - beliebige Aminosäure). Nahezu invariabel ist dabei das doppelte Arginin-Motiv, nach dem dieser Transportweg benannt ist (*Twin-Arginine-Transporter* - Tat) (Natale *et al.*, 2008). Auf das Sec-Transportsystem wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

### 1.3.2.1 Der Sec-Transportweg

Der Sec-Transportweg (*Secretion pathway* - Sec) kann Membranproteine in der inneren Membran verankern, Lipoproteine ins Periplasma translozieren und dort zur Maturation führen sowie periplasmatisch lösliche Proteine exportieren (Abb. 1.3). Dabei greifen grundsätzlich zwei unterschiedliche Wege für das Dirigieren der Zielproteine zum Transporterkomplex, die beide Chaperon-abhängig sind (Chatzi *et al.*, 2013). Beim sogenannten ko-translationalen Weg sorgt SRP (*Signal Recognition Particle*) dafür, dass ein Komplex aus Ribosom, SRP und dem entstehenden Protein zum Translokationssystem geleitet wird. Auf dem post-translationalen Weg erkennt TF (*trigger factor*) die Polypeptide und sorgt für die Anlagerung von Chaperonen wie SecB an die ungefalteten Polypeptide (Randall *et al.*, 1997). SecB gibt anschließend die Präproteine an SecA ab (Randall *et al.*, 2005).

SecA - eine ATPase - ist eine essenzielle Komponente des Transporterkomplexes, die auf der cytoplasmatischen Seite am Sec-Membrankanale assoziiert ist und als Motorprotein wesentlich für den Export des Präproteins verantwortlich ist (Natale *et al.*, 2008). Der Membrankanale wird durch die drei Proteine SecY, SecE und SecG aufgebaut. Jede Spaltung eines Moleküls ATP durch SecA führt zu einer Einführung von 20-30 Aminosäuren des Präproteins in den SecYEG-Kanal (van der Wolk *et al.*, 1997). Der Transport von Proteinen über den Sec-Weg stellt somit einen Energie-intensiven Prozess dar. Der Einfluss der PMF (*Proton Motive Force*) ist noch nicht vollends verstanden, scheint aber den Proteinexport, nach Initiation durch SecA, vorantreiben zu können (Yamada *et al.*, 1989). Darüber hinaus wird in diesem Zuge spekuliert, dass die Proteine SecD und SecF an den letzten Schritten der Proteintranslokation beteiligt sein könnten (Lycklama a Nijeholt & Driessen, 2012).

Trotz dieses komplexen Systems liegt die berechnete Translokationsrate bei ca. 270 AS/min und ist im Vergleich zu ca. 240-300 AS/min elongierten Aminosäuren pro Minute während der Translation erstaunlich effizient (Tomkiewicz *et al.*, 2006, Hebert & Molinari, 2007 und Chatzi *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.3: Schema des Sec-Transportweges zum Proteinexport ins bakterielle Periplasma (verändert nach Chatzi *et al.*, 2013).** Die Darstellung zeigt ein vereinfachtes Modell der verschiedenen Schritte, die zum Export von Präproteinen (orange) über die Sec-Maschinerie gehören. Zunächst erfolgt der Transport eines Polypeptids über den post- (I - links) oder ko-translationalen (I - rechts) Weg zum Sec-Transportkomplex. Dabei stellt SRP den sogenannten *signal recognition particle* dar. Der Transportkomplex besteht aus der ATPase SecA und den drei Membranproteinen SecYEG. Letztere bilden den Tunnel, durch den das Präprotein exportiert wird. Auf der periplasmatischen Seite des Transporters wird dieser Prozess möglicherweise durch SecDF unterstützt. Die Trennung von Signalsequenz und Protein erfolgt durch eine Signalpeptidase (II), abgekürzt SPase. Das freie Protein dissoziiert vom Transporter ab, wodurch dieser für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung steht (III).

### 1.3.2.2 Signalsequenzen für den periplasmatischen Export

Die Signalsequenz für den periplasmatischen Export über den Sec-Weg besitzt vier Hauptmerkmale. Dabei beginnt die Signalsequenz mit einer positiv geladenen N-terminalen Region, setzt sich über einen hydrophoben Kern fort und endet mit einer polaren C-terminalen Region innerhalb der Signalsequenz (Paetzel *et al.*, 2002). Das vierte Merkmal besteht in der Regel aus einem Sequenzmotiv, zwischen Signal- und Proteinsequenz, für die Signalpeptidasen I und II (SPase I und II). Wenn dieses Sequenzmotiv fehlt, dient die N-terminale Signalsequenz häufig als Trans-Membran-Domäne (TMD) und führt zur Verankerung des Polypeptids in der inneren Membran (Natale *et al.*, 2008). Als Signalsequenz für SPase I liegt allgemein ein AxA-Motiv vor. Hierbei wird die Signalsequenz hinter dem zweiten Alanin abgeschnitten, was in der Regel zu periplasmatisch löslichen Proteinen führt. Die Erkennungssequenz für die SPase II wird als Lipobox bezeichnet. Als Motiv kommt hier eine L[A/S][G/A]C-Aminosäureabfolge vor (Hayashi & Wu, 1990), wobei der Verdau erst nach einem weiteren Maturationsschritt vollzogen

wird (Tokuda, 2009). Die Maturation von Lipoproteinen wird im folgenden Kapitel genauer erläutert.

### 1.3.3 Lipoproteinbiogenese

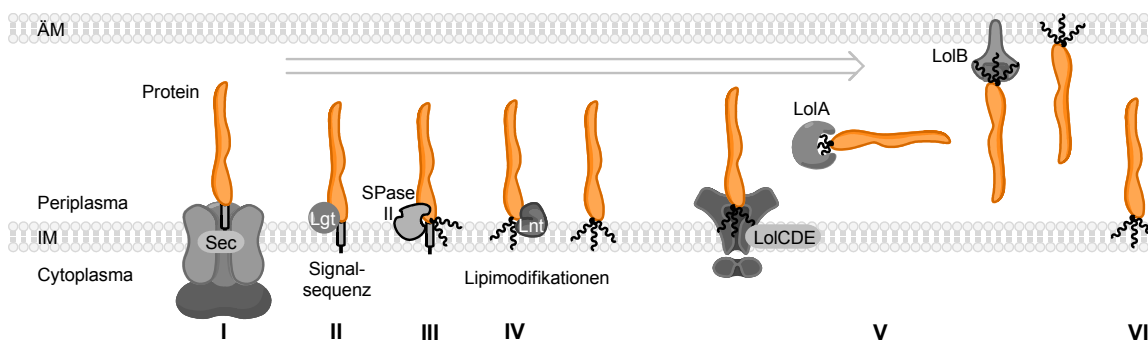
Lipoproteine besitzen wie bereits erwähnt eine sogenannte Lipobox in ihrer Signalsequenz (1.3.2.2) und werden für gewöhnlich von der Signalpeptidase II im Periplasma verarbeitet (Hayashi & Wu, 1990). Dies geschieht allerdings erst nach einem weiteren Maturationsschritt. Lipoproteine besitzen eine Proteindomäne, die über ein Cystein mit einer Lipiddomäne verbunden wird. In gramnegativen Bakterien führt diese Struktur dazu, dass Lipoproteine in der inneren oder äußeren Membran verankert sein können (Tokuda, 2009). Wie für den Export ins Periplasma gibt es auch für die Sortierung des Lipoproteins in die innere oder äußere Membran eine Erkennungssequenz (Okuda & Tokuda, 2011).

Nachdem das Präprotein durch den Sec-Transportweg weitestgehend in das Periplasma überführt wurde und durch die hydrophobe Signalsequenz an der Membran fixiert wurde, kommt es zunächst zur Anlagerung eines Diacylglycerols an das Cystein der Lipobox (L[A/S][G/A]C). Dieser Schritt wird durch das hochkonservierte Protein Lgt (Phosphatidylglycerol/Prolipoprotein Diacylglycerol Transferase) katalysiert, wobei eine Thioether-Bindung zwischen einem terminalen Kohlenstoff des Diacylglycerols und der Thiolgruppe der Cysteinseitenkette erzeugt wird (Sankaran & Wu, 1994). Daraufhin kommt es zum Abtrennen der Signalsequenz, sodass der Cysteinrest zum neuen N-Terminus des Proteins wird. Diese Umsetzung wird von der Signalpeptidase II (auch LspA genannt) durchgeführt (Tokunaga *et al.*, 1984). Das Apolipoprotein bleibt trotz des Abtrennens der hydrophoben Signalsequenz weiterhin in der Membran verankert. Diese Assoziation wird nun jedoch durch den Diacylglycerolrest bewirkt. Der freie N-Terminus des Cysteins wird im letzten Biogeneseschritt durch eine N-Acylierung mit einem Phospholipid verknüpft. Das hierbei aktive Enzym ist die Phospholipid/Apolipoprotein Transacylase Lnt (Sankaran & Wu, 1994).

Der Verbleib des Lipoproteins in der inneren Membran hängt von der Interaktion der proteineigenen Erkennungssequenz mit den Proteinen des Lol-Systems ab. Das Lol-System besteht dabei aus den Proteinen LolABCDE (Matsuyama *et al.*, 1995, Matsuyama *et al.*, 1997, Yakushi *et al.*, 2000 und Tanaka *et al.*, 2007). LolCDE ist hierbei ein in der inneren Membran lokalisierter ABC-Transporter, der - sofern eine Signalsequenz erkannt wird - das Lipoprotein unter ATP-Hydrolyse an das periplasmatische Chaperon LolA abgibt. LolA maskiert dabei durch Interaktion mit dem Lipoprotein dessen hydrophoben Lipidanker und transportiert das Protein

zum Rezeptor LolB, der an der äußeren Membran assoziiert ist und das Lipoprotein in die äußere Membran einbaut (Okuda & Tokuda, 2011). Wird die N-terminale Sortierungssequenz des Lipoproteins nicht vom Lol-System erkannt, bleibt das Protein in der inneren Membran verankert.

In *Escherichia coli* ist hauptsächlich Aspartat an Position +2 nach dem Cystein der Lipobox entscheidend dafür, dass das Lipoprotein in der inneren Membran verbleibt (Yamaguchi *et al.*, 1988 und Tokuda & Matsuyama, 2004). In *P. aeruginosa* sind zusätzlich die Aminosäuren an den Positionen +3 bis +4 für eine Verankerung in der inneren Membran wichtig (Narita & Tokuda, 2007 und Lewenza *et al.*, 2008). Das Prinzip der Lipoproteinbiogenese ist in Abbildung 1.4 zusammengefasst.

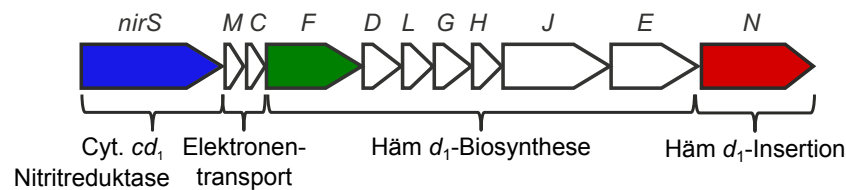


**Abbildung 1.4: Das Prinzip der Lipoproteinbiogenese und des Lol-Sortierungsapparats (verändert nach Okuda & Tokuda, 2011).** Die Abbildung zeigt, wie ein Prälipoprotein (orange) nach dem Transport durch den Sec-Komplex (I) prozessiert wird. Zunächst kommt es zu einer Verknüpfung des Proteins mit einem Diacylglycerol durch Lgt (II). Im Anschluss trennt die Signalpeptidase II (Spase II) die Signalsequenz ab (III). Der freie N-terminus wird im letzten Schritt durch Lnt N-acyliert (IV). Das maturierte Lipoprotein wird daraufhin entweder vom LolABCDE-System zur äußeren Membran dirigiert (V) oder verbleibt verankert in der inneren Membran (VI).

## 1.4 Das *nir*-Operon in *Pseudomonas aeruginosa*

Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid wird in *P. aeruginosa* durch die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase NirS ermöglicht (siehe auch 1.2.2). Das dazu nötige *nirS*-Gen befindet sich im sogenannten *nir*-Operon (Abb. 1.5) (Kawasaki *et al.*, 1997). Das Operon besteht darüber hinaus aus zehn weiteren Genen, denen verschiedene, zum Teil hypothetische, Aufgaben zugeschrieben werden. Die Gene *nirMC* sollen für Proteine kodieren, die potentielle Elektronendonatoren für die Nitritreduktion darstellen (Hasegawa *et al.*, 2001 und Zajicek *et al.*, 2009).

Die sieben Gene *nirFDLGHJE* zeichnen sich für Proteine der Häm  $d_1$ -Biosynthese verantwortlich (Kawasaki *et al.*, 1997). Das Protein NirN spielt laut Zajicek *et al.* (2009) möglicherweise bei der Übertragung des Häm  $d_1$  auf die Nitritreduktase eine Rolle.



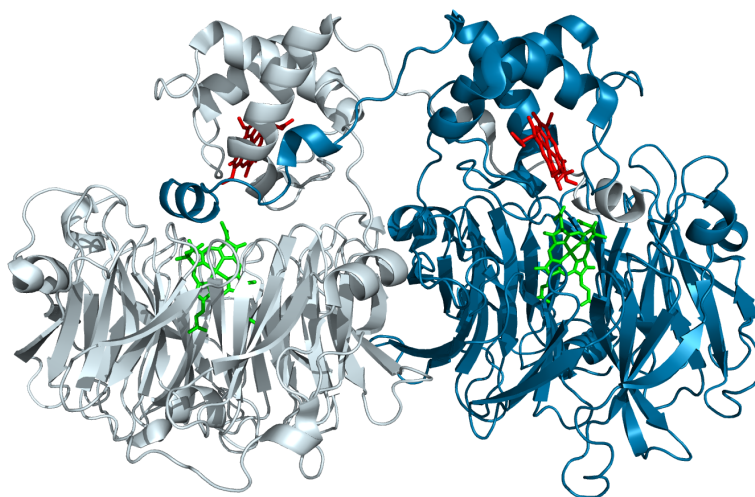
**Abbildung 1.5: *nir*-Operon aus *P. aeruginosa* (Winsor *et al.*, 2011).** Das dargestellte Schema zeigt das *nir*-Operon von *P. aeruginosa*, wobei die Länge der Pfeile den relativen Gengrößen entspricht. Das Operon beginnt mit *nirS* (blau), welches für die Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase (Cyt. - Cytochrom) kodiert. Abwärts davon befinden sich die zwei Gene *nirM* und *nirC*, die für potentielle Elektronentransferproteine des Periplasmas kodieren. Diese können als Elektronendonoren für die Nitritreduktion fungieren. Die folgenden sieben Gene *nirF* (grün) bis *nirE* kodieren Proteine die an der Häm  $d_1$ -Biosynthese beteiligt sind (Kawasaki *et al.*, 1997). Das Gen *nirN* (rot) kodiert für ein potentielles Häm  $d_1$ -Insertionsprotein.

### 1.4.1 Die Cytochrom $cd_1$ Nitritreduktase NirS

Die Nitritreduktase NirS stellt das wohl am besten charakterisierte Protein des *nir*-Operons dar (Rinaldo *et al.*, 2008). Es wurde bereits aus verschiedenen Organismen (z. B. *P. aeruginosa* und *Paracoccus pantotrophus*) chromatographisch gereinigt und sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert (Nurizzo *et al.*, 1997 und Williams *et al.*, 1997). Bei NirS handelt es sich um ein Homodimer aus zwei ca. 60 kDa großen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten enthält ein kovalent gebundenes Häm  $c$  und ein nicht-kovalent gebundenes Häm  $d_1$  (Abb. 1.6, Nurizzo *et al.*, 1997). Die NirS wird auf dem Weg ihrer Maturation durch das Sec-Transportsystem in das Periplasma von *P. aeruginosa* exportiert (Thöny-Meyer & Künzler, 1997), wobei auch die Abtrennung des N-terminalen Signalpeptids erfolgt. Die im Anschluss ablaufenden Kofaktorinsertionen laufen in noch unbekannter Reihenfolge ab. Die kovalente Anbindung von Häm  $c$  an die N-terminale Domäne erfolgt über das CxxCH-Motiv des Proteins (Thöny-Meyer, 2002). Die Häm  $d_1$ -bindende Domäne des Proteins besteht aus einem achtfachen  $\beta$ -Faltblattpropeller und bindet den Kofaktor nicht kovalent sondern hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen (Nurizzo *et al.*, 1997). Über den Einbau des Häm  $d_1$  besteht bisher nur wenig Klarheit. So ist bekannt, dass Häm  $d_1$  *in vitro* von NirN auf NirS übertragen werden kann (Zajicek *et al.*, 2009). Die Aufnahme des Kofaktors bzw. verschiedener Kofaktorderivate

in das aktive Zentrum der NirS kann *in vitro* jedoch auch ohne Zugabe von NirN herbeigeführt werden, um eine aktive Nitritreduktase zu erzeugen (Hill & Wharton, 1978 und Chang, 1994).

Im Unterschied zur Kupfer-enthaltenden Nitritreduktase NirK (Tavares *et al.*, 2006), die z. B. in *Pseudomonas aureofaciens* zu finden ist, bindet die NirS kein Kupfer im aktiven Zentrum, sondern führt die Reduktion von Nitrit am zentralen Eisen des Häm  $d_1$  durch (Cutruzzolà *et al.*, 2003). Dazu wird ein Elektron von einem geeigneten Elektronendonator durch Häm  $c$  aufgenommen, im Zuge der Katalyse auf den zweiten Kofaktor Häm  $d_1$  übertragen und dort zur Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid genutzt (Rinaldo *et al.*, 2011). Da das enzymgebundene Häm  $d_1$  eine geringere Bindungsaffinität zu Stickstoffmonoxid als zu Nitrit besitzt, dissoziiert NO nach der Reduktion vom Kofaktor ab, sodass  $\text{NO}_2^-$  neu gebunden werden kann (Rinaldo *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.6: Kristallstruktur der Nitritreduktase NirS (Nurizzo *et al.*, 1997).** Die Struktur zeigt das Dimer der NirS aus *P. aeruginosa* zusammen mit den insgesamt vier Kofaktoren. Häm  $c$  ist dabei in rot dargestellt, während Häm  $d_1$  grün gefärbt ist. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 2.15 Å erhalten.

Die Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase ist bifunktional und kann ebenso die vier-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysieren. Im Falle der *Pa. pantotrophus* Nitritreduktase ergeben sich unter Sauerstoffexposition starke Konformationsänderungen des Proteins (Sjögren & Hajdu, 2001).

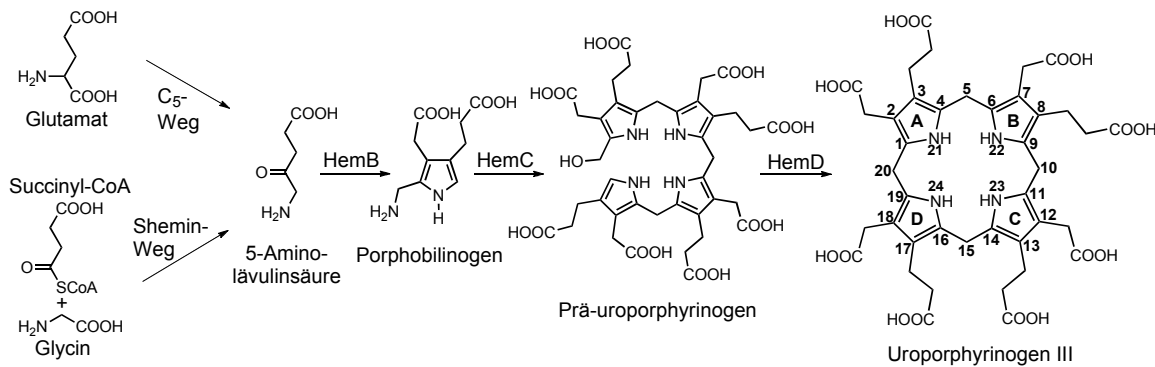


## 1.4.2 Die Häm-Biosynthese und das Cytochrom *c* Maturationssystem

Die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase benötigt zwei essenzielle Kofaktoren, um aktiv zu sein. Das Häm *c* leitet dabei die Elektronen zum zweiten Kofaktor Häm *d*<sub>1</sub>, der die Reduktion von Nitrit katalysiert. Im folgenden Kapitel wird nun auf die Häm-Biosynthese und die Biogenese von *c*-Typ Cytochromen im periplasmatischen Raum von gramnegativen Bakterien eingegangen.

### 1.4.2.1 Die Bildung von Uroporphyrinogen III

Der strukturelle Aufbau von Tetrapyrrolen legt nahe, dass es sich bei weiten Teilen der Biosynthese um einen geteilten Weg handelt. Der Vorläufer aller Tetrapyrrole ist zunächst 5-Aminolävulinsäure (ALA). ALA kann auf zwei unterschiedlichen Wegen hergestellt werden (Abb. 1.7). Der Shemin-Weg, ausgehend von Succinyl-CoA und Glycin, dient Säugern und  $\alpha$ -Proteobakterien zur Herstellung von ALA (Shemin *et al.*, 1955), wohingegen viele andere Bakterien, Pflanzen und Archaea auf den C<sub>5</sub>-Weg, ausgehend von Glutamat, zurückgreifen (Beale *et al.*, 1975). Zwei ALA-Moleküle werden durch die Porphobilinogen-Synthase (HemB) unter asymmetrischer Kondensation zu einem Molekül Porphobilinogen (PBG) umgesetzt (Frankenberg *et al.*, 1999). Aus vier PBG-Molekülen wird das Prä-uroporphyrinogen durch die PBG-Deaminase (HemC) aufgebaut (Louie *et al.*, 1996). Dieses instabile Molekül ist ein linear verknüpftes Tetrapyrrol und zugleich der Vorläufer von Uroporphyrinogen III (Jordan, 1994). Im letzten Schritt erfolgt eine Inversion des D-Rings (siehe auch Benennung von zyklischen Tetrapyrrolen in Abb. 1.7) von Prä-uroporphyrinogen und eine Zyklisierung zum Tetrapyrrolringsystem. Dies wird durch die Uroporphyrinogen III-Synthase HemD katalysiert (Silva & Ramos, 2008). Uroporphyrinogen III (Urogen III) stellt den ersten Verzweigungspunkt für die Biosynthese verschiedener Tetrapyrrolkofaktoren dar. Von hier aus gehen Wege für Häme und Chlorophylle sowie für Porphinoide wie Häm *d*<sub>1</sub>, Vitamin B<sub>12</sub> oder den Kofaktor F<sub>430</sub> ab (Layer *et al.*, 2010).

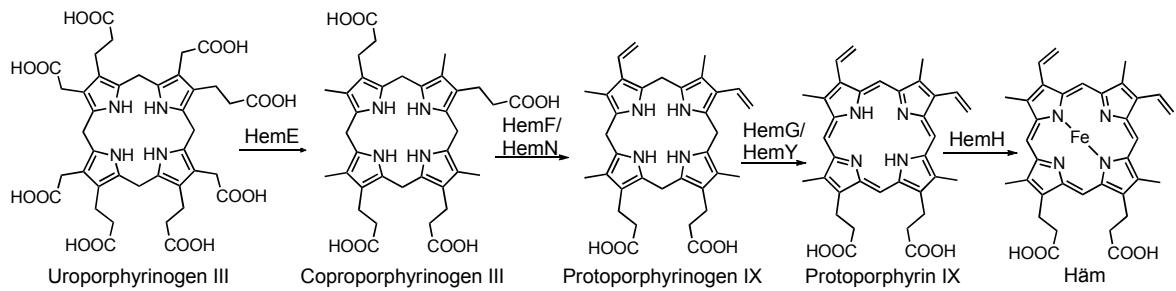


**Abbildung 1.7: Die Uroporphyrinogen III-Biosynthese (verändert nach Layer *et al.*, 2010).**

5-Aminolävulinsäure kann über den C<sub>5</sub>-Weg oder den Shemin-Weg erzeugt werden. Zwei Moleküle ALA werden dann zu Porphobilinogen durch HemB kondensiert. Vier Einheiten PBG werden zu Prä-uroporphyrinogen verknüpft (katalysiert durch HemC). Durch die Inversion des D-Rings und anschließende Zyklisierung wird Uroporphyrinogen III durch HemD erzeugt. Die Struktur von Uroporphyrinogen III zeigt die allgemeine Zuweisung der Ringe A-D sowie die typische Nummerierung der C- und N-Atome (1-24) von zyklischen Tetrapyrrolen.

#### 1.4.2.2 Die Bildung von Häm

Das Uroporphyrinogen III stellt den Vorläufer des Häms dar, der in noch vier weiteren enzymatischen Reaktionen prozessiert wird. Zunächst erfolgt, wie in Abbildung 1.8 zu sehen ist, eine vierfache Decarboxylierung durch HemE, bei der alle Acetatseitenketten von Uroporphyrinogen III zu Methylgruppen umgesetzt werden (Whitby *et al.*, 1998). Das so gebildete Coproporphyrinogen III wird anschließend zu Protoporphyrinogen IX umgesetzt. Hierbei werden die beiden Propionatgruppen an Ring A und Ring B unter der Abspaltung von zwei Molekülen CO<sub>2</sub> zu Vinylgruppen umgesetzt. In *E. coli* geschieht dies unter anaeroben Bedingungen durch die Coproporphyrinogen III-Dehydrogenase HemN, ein Enzym der „Radical SAM“-Familie (Layer *et al.*, 2003). Unter aeroben Bedingungen wird die Bildung von Protoporphyrinogen IX durch das sauerstoffabhängige Enzym HemF katalysiert (Breckau *et al.*, 2003). Die Synthese von Protoporphyrin IX wird durch Protoporphyrinogen IX Oxidasen durchgeführt (HemY oder HemG). Dabei werden sechs Elektronen abstrahiert und ein planares konjugiertes Tetrapyrrolringsystem erzeugt (Koch *et al.*, 2004 und Möbius *et al.*, 2010). Der letzte Schritt der Häm-Biosynthese wird von der Ferrochelatase HemH durchgeführt. Hierbei wird das zentrale Eisenion in den Makrozyklus inseriert (Dailey & Dailey, 2002).



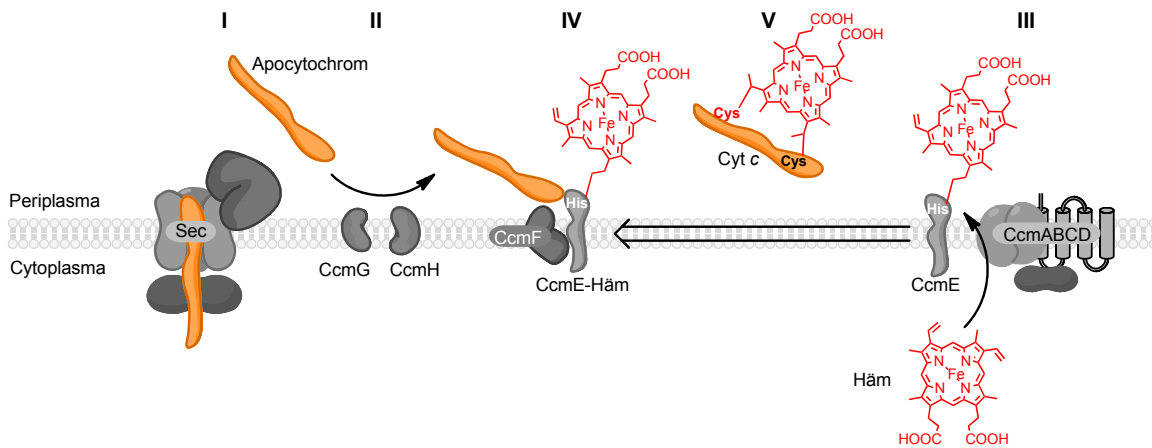
**Abbildung 1.8: Die Häm-Biosynthese (verändert nach Layer *et al.*, 2010).** Die Häm-Biosynthese ist hier ausgehend von Uroporphyrinogen III dargestellt. Urogen III wird durch HemE zu Coproporphyrinogen III umgesetzt. Protoporphyrinogen IX wird durch oxidative Decarboxylierung erzeugt. Die letzten beiden Schritte werden durch HemY bzw. HemG und HemH katalysiert. Dabei wird zunächst Protoporphyrin IX erzeugt und dieses schließlich, durch Insertion eines Eisenions, zu Häm umgesetzt.

### 1.4.2.3 Das Cytochrom c Maturationssystem

Die Familie der *c*-Typ Cytochrome ist durch eine kovalente Verknüpfung eines Häm-Kofaktors an das Protein charakterisiert. Für die Biogenese der Mitglieder dieser Proteinfamilie sind verschiedene Maturationssysteme bekannt. *E. coli* und *P. aeruginosa* nutzen das komplexe Cytochrom *c* Maturationssystem I (Ccm) (Thöny-Meyer, 2002). Dabei sind die notwendigen Gene in einem Operon (*ccmABCDEFGH*) zusammengefasst. CcmH besteht in *E. coli* aus einem Fusionsprotein (Stevens *et al.*, 2011), das äquivalent zu CcmH und Cych von *P. aeruginosa* ist (Winsor *et al.*, 2011). Darüber hinaus sind die Proteine für die Disulfidbrückenmaturation (Dsb-Proteine) zusammen mit CcmH und Cych wichtig für den Einbau von Häm in das Apocytochrom *c* (Daltrop *et al.*, 2002, Shouldice *et al.*, 2011 und Stevens *et al.*, 2011).

Das Apocytochrom wird über den Sec-Transportweg ins Periplasma von gramnegativen Bakterien überführt (1.3.2.1). Häm wird durch die Proteine CcmABCD ins Periplasma exportiert (Abb. 1.9). Dabei ist zu erwähnen, dass alle Proteine des Ccm I-Systems Membranproteine sind, mit Ausnahme des ATP hydrolysierenden Proteins CcmA, welches im Cytoplasma lokalisiert ist (Sawyer & Barker, 2012). Der CcmABCD-Komplex überträgt Häm auf CcmE, welches den Kofaktor über ein Histidin an einer der Vinylgruppen von Ring A oder B bindet (Lee *et al.*, 2005). CcmF kann CcmE-Häm reduzieren und aktiviert es möglicherweise für die Häm-Übertragung in das Zielprotein - der genaue Zusammenhang ist allerdings noch unklar (Sawyer & Barker, 2012). Das Apoprotein wird möglicherweise einigen Thiolreduktionen durch das Dsb-System, CcmG und CcmH (CcmH/Cych) unterzogen, um seinerseits für die Verknüpfung mit Häm aktiviert zu sein (Stevens *et al.*, 2011). Das Häm wird dann durch einen

noch unklaren Mechanismus von CcmE, unter möglicher Beteiligung von CcmF, auf das Apocytochrom übertragen und mit den beiden Cysteinen des CxxCH-Motivs kovalent verknüpft. Das C-terminale Histidin des CxxCH-Motivs dient als proximaler Ligand für das zentrale Eisen des Häm c (Sawyer & Barker, 2012).

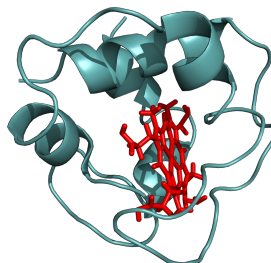


**Abbildung 1.9: Modell des Cytochrom c Maturationssystems I (verändert nach Stevens et al., 2011 und Sawyer & Barker, 2012).** Nachdem das Präprotein (orange) durch das Sec-Transportsystem ins Periplasma sekretiert worden ist (I), folgt möglicherweise eine Reihe von Thiolreduktionen durch CcmGH (II). Häm (rot) wird durch den Proteinkomplex CcmABCD an CcmE gebunden (III). CcmE überträgt dann, möglicherweise mit Hilfe von CcmF, den Kofaktor auf das Zielprotein (IV). Das erzeugte c-Typ Cytochrom (Cyt c) dissoziiert vom Ccm-System ab (V).

### 1.4.3 Die c-Typ Cytochrome NirM und NirC

Die c-Typ Cytochrome NirM und NirC sind im *nir*-Operon von *P. aeruginosa* direkt abwärts der NirS kodiert (Abb. 1.5). Dennoch besitzen nicht alle Denitrifizierer, wie z. B. *Pa. pantotrophus*, das *nirM*-Gen (Zajicek et al., 2009). Beide stellen periplasmatische Proteine mit CxxCH-Motiven zur Häm c-Bindung dar und können als Elektronendonoren für die Nitritreduktase fungieren (Hasegawa et al., 2001). Detlefsen et al. (1991) nahmen die in Abbildung 1.10 dargestellte NMR-Struktur des auch als Cytochrom  $c_{551}$  bekannten NirM auf. Wie Hasegawa et al. (2001) zeigten, handelt es sich bei NirM aus *P. aeruginosa* um einen zehnfach stärkeren Elektronendonator für die Nitritreduktase als NirC. Die Rolle von NirC in *Pa. pantotrophus* als physiologischer Elektronendonator für NirS wird bezweifelt, da z. B. Pseudoazurin als physiologischer Elektronendonator für die NirS in *Pa. pantotrophus* dienen kann (Pearson et al., 2003). Wie Zajicek et al. (2009) berichteten, ist NirC allerdings in der Lage Elektronen auf ein an NirN gebundenes Häm  $d_1$  zu übertragen. Da NirM ein stärkerer Elektronendonator als NirC ist, wird vermutet, dass es erst später in das *nir*-Operon aufgenommen wurde und es sich bei NirC

um den - evolutionär betrachtet - älteren Elektronendonator der NirS handelt (Hasegawa *et al.*, 2001). Des Weiteren wird vermutet, dass *nirM* in anderen Spezies durch Genduplikation neue *c*-Typ Cytochrome hervorgebracht hat (Nagashima *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.10: NMR-Struktur der NirM (Detlefsen *et al.*, 1991).** Die Abbildung zeigt die NirM-Struktur aus *P. aeruginosa*. Der enthaltene Kofaktor Häm *c* ist in Rot dargestellt.

#### 1.4.4 Die Häm $d_1$ -Biosynthese und die beteiligten Enzyme

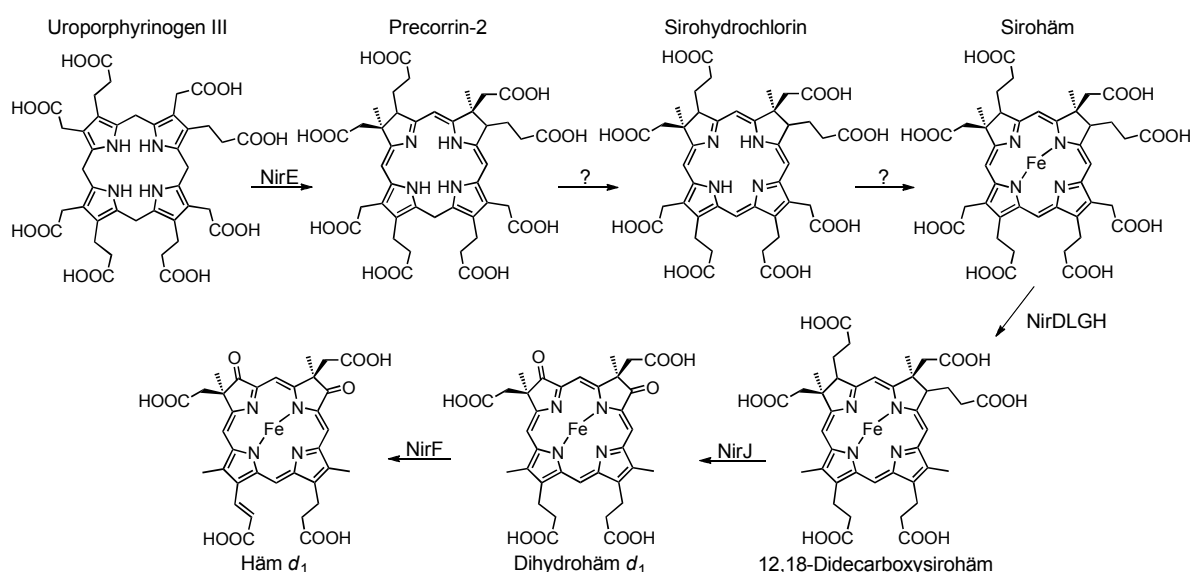
Häm  $d_1$  stellt, wie in 1.4.1 beschrieben, einen für die Funktion der Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase essenziellen Kofaktor dar. In diesem Kapitel wird die Biosynthese des Kofaktors sowie die beteiligten Enzyme ausführlicher betrachtet.

##### 1.4.4.1 Die Häm $d_1$ -Biosynthese

Die Abbildung 1.11 zeigt die Struktur des Isobacteriochlorins Häm  $d_1$  sowie seinen Biosyntheseweg. Die vollständige Aufklärung der Kofaktorstruktur gelang Micklefield *et al.* im Jahr 1993. Es handelt sich um ein Molekül, das in reiner Form grün ist und ein zentrales Eisenion bindet. Durch dieses Eisenion ist das Tetrapyrrol nicht planar, sondern leicht gewölbt, wobei das Zentralatom aus der Ebene herausragt (Barkigia *et al.*, 1992). Der Kofaktor Häm  $d_1$  kommt nur in der Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase vor. Hier ermöglicht dessen hohe Affinität zu Nitrit und niedrigere Affinität zu Stickstoffmonoxid, dass gebildetes Stickstoffmonoxid rasch vom Kofaktor durch ein weiteres Nitrit-Molekül verdrängt werden kann und so eine effiziente Katalyse gewährleistet wird (Rinaldo *et al.*, 2007 und Rinaldo *et al.*, 2011).

Wie auch Häm wird Häm  $d_1$  ausgehend von Uroporphyrinogen III gebildet (vergleiche 1.4.2.2). Als erstes Enzym katalysiert NirE die Umsetzung zu Precorrin-2 und führt dabei zwei Methylgruppen stereospezifisch an den Positionen C2 von Ring A und C7 von Ring B ein (Storbeck *et al.*, 2011). Die im Anschluss ablaufenden Prozesse sind unklar, allerdings geht man davon aus, dass durch Dehydrierung eine zusätzliche Doppelbindung in das Ringsystem bei C14-C15

eingeführt wird und der Einbau des zentralen Eisenions stattfindet. Bekannt hingegen ist wiederum, dass Sirohäm das Substrat für den Enzymkomplex NirDLGH darstellt. Die Bildung von 12,18-Didecarboxysirohäm erfolgt unter Abspaltung von zwei  $\text{CO}_2$  an den Acetatseitenketten von Ring C und Ring D (Bali *et al.*, 2011). Die Einführung von zwei Ketofunktionen an C3 und C8 könnte durch NirJ vollzogen werden (Brindley *et al.*, 2010). Für den letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese, die Einführung einer Doppelbindung in die Propionatseitenkette des C17 an Ring D, kommt NirF in Frage (Bali *et al.*, 2010). Auf die einzelnen Schritte der Häm  $d_1$ -Biosynthese wird in den folgenden Kapiteln detailliert eingegangen.

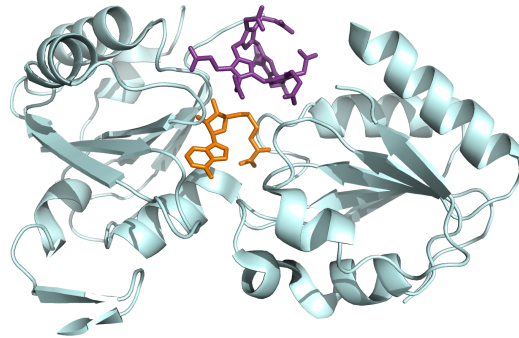


**Abbildung 1.11: Die Häm  $d_1$ -Biosynthese (verändert nach Bali *et al.*, 2011).** Ausgehend von Uroporphyrinogen III wird Precorrin-2 erzeugt. Dabei methyliert NirE die Positionen C2 und C7. Die Schritte zur Bildung von Sirohäm sind noch unklar. Es wird vermutet, dass Sirohydrochlorin die Zwischenstufe bildet. Sirohäm wird durch den Enzymkomplex NirDLGH zu 12,18-Didecarboxysirohäm umgesetzt. Man nimmt an, dass die letzten zwei Schritte der Häm  $d_1$ -Biosynthese durch die Proteine NirJ und NirF katalysiert werden. Hierbei sollte Dihydrohäm  $d_1$  als Zwischenprodukt entstehen.

#### 1.4.4.2 Die Methyltransferase NirE

Kawasaki *et al.* postulierten 1997, dass es sich bei NirE aus *P. aeruginosa* um eine S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase (SUMT) handeln könnte. Diese Annahme beruhte auf der hohen Aminosäuresequenzhomologie von NirE zu anderen SUMTs wie z. B. CysG oder CobA. Schließlich konnte von Storbeck *et al.* (2009) mittels biochemischer Untersuchungen bestätigt werden, dass NirE aus *P. aeruginosa* tatsächlich eine SUMT darstellt. NirE kommt als Homodimer vor und katalysiert die Umsetzung von

Uroporphyrinogen III zu Precorrin-2 unter Verbrauch von SAM zu *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). Dabei führt NirE zwei Methylgruppen in das Tetrapyrrol Uroporphyrinogen III ein. Im Jahr 2011 konnten Storbeck *et al.* die Kristallstruktur (Abb. 1.12) von NirE im Komplex mit dessen Substrat und dem Reaktionsprodukt SAH lösen und einen Reaktionsmechanismus für den Methylgruppentransfer formulieren.



**Abbildung 1.12: Kristallstruktur der Methyltransferase NirE (Storbeck *et al.*, 2011).** Die Struktur zeigt eine monomere Einheit der SAM-abhängigen Methyltransferase NirE (cyan) aus *P. aeruginosa* in Komplex mit SAH (orange) und Uroporphyrinogen III (violett). Aufgenommen wurde diese Struktur mit einer Auflösung von 2.00 Å.

#### 1.4.4.3 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDLGH

Die Proteine NirD und NirG aus *P. aeruginosa* besitzen eine 42-prozentige Aminosäuresequenzidentität zueinander und sind beide ca. 17 kDa groß. Die Proteine NirL und NirH sind zu 35 % identisch und jeweils etwa 20 kDa groß. Diese vier Proteine sind im Cytoplasma von *P. aeruginosa* lokalisiert. In manchen denitrifizierenden Bakterien wie z. B. *Pa. pantotrophus* und *Hydrogenobacter thermophilus* sind die *nirD*- und *nirL*-Gene fusioniert, was zu der Bildung eines Fusionsproteins NirDL führt. Für die Proteine aus *P. aeruginosa* konnte durch Ko-Reinigungsexperimente gezeigt werden, dass NirD und NirL bzw. NirG und NirH die stabilen heterodimeren Komplexe NirDL und NirGH bilden (Walther, 2011). Interessanterweise scheinen die Proteine NirDL und NirGH bifunktionell zu sein. Zum einen wurde für die Proteine NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* gezeigt, dass sie *in vitro* Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm umsetzen können. Dies verläuft über ein nicht näher analysiertes Monodecarboxysirohäm-Zwischenprodukt (Bali *et al.*, 2011). Aktuelle Ergebnisse deuten auf die gleiche enzymatische Aktivität der *P. aeruginosa* Homologe hin (pers. Mitteilung K. Haufschildt, 2013). Zum anderen wurden die Proteine NirDLGH in den Datenbanken auch als potentielle Transkriptionsregulatoren annotiert und hierbei der Familie der AsnC/Lrp-Transkriptionsregulatoren

zugeordnet (Winsor *et al.*, 2011). Die Namensgebung richtet sich dabei nach den in *E. coli* bekannten Regulatoren AsnC (*asparagine synthase C*) und Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*). Im Jahr 2007 konnten Xiong *et al.* zeigen, dass NirL aus *Heliophilum fasciatum* *in vitro* an ein DNA-Fragment 200 bp aufwärts des *nirJ*-Gens in *He. fasciatum* bindet. Oglesby-Sherrouse & Vasil zeigten 2010, dass es sich bei *nirL* aus *P. aeruginosa* um ein durch Eisen und Häm reguliertes Gen handelt. Für NirDL und NirGH aus *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass diese Proteine an eine Promotorregion aufwärts des *nirJ*-Gens in *P. aeruginosa* binden und dadurch höchstwahrscheinlich die Expression der nachfolgenden Gene *nirJEN* erhöhen (Walther, 2011). Daher wird derzeit angenommen, dass NirDLGH sowohl eine regulatorische als auch eine enzymatische Funktion besitzen.

Für das Fusionsprotein NirDL aus *H. thermophilus* (homolog zu NirD und NirL aus *P. aeruginosa*) konnte eine Röntgenkristallstruktur aufgenommen werden, die ein Substratanalogon im aktiven Zentrum enthält (pers. Mitteilung K. Haufschildt, 2013).

#### 1.4.4.4 Das Eisen-Schwefel-Protein NirJ

Bei dem Protein NirJ handelt es sich um ein etwa 44 kDa großes cytoplasmatisches Protein. Eine N-terminale Aminosäuresequenz (Cx<sub>3</sub>Cx<sub>2</sub>C) (Winsor *et al.*, 2011) deutet darauf hin, dass dieses Protein zur Familie der „Radical SAM“-Proteine gehört, welche alle ein essenzielles [4Fe-4S]-Zentrum enthalten (Sofia *et al.*, 2001). Für die homologen Proteine aus *Pa. pantotrophus* und *H. thermophilus* konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Proteine [4Fe-4S]-Zentren binden (Brindley *et al.*, 2010 und Walther, 2011). Des Weiteren konnten Brindley *et al.* im Jahr 2010 zeigen, dass NirJ aus *Pa. pantotrophus* unter reduzierenden Bedingungen in der Lage ist SAM zu binden. Darüber hinaus wurde allerdings noch keine katalytische Aktivität für NirJ nachgewiesen. Derzeit geht man davon aus, dass NirJ im Laufe der Häm d<sub>1</sub>-Biosynthese die zwei Ketofunktionen an den Ringen A und B an den Positionen C3 und C8 einführt. Als Substrat für NirJ kommt 12,18-Didecarboxysirohäm in Frage, da aufgrund von Sequenzhomologie zu AbhC aus der alternativen Häm-Biosynthese angenommen wird, dass diese beiden Enzyme das gleiche Substrat verstoffwechseln (Bali *et al.*, 2011).

#### 1.4.4.5 Die potentielle Dehydrogenase NirF

Das Protein NirF ist bisher nur wenig charakterisiert. So zeigen Aminosäuresequenzvergleiche zu NirS, dass eine 20-prozentige Identität zwischen den beiden Proteinen besteht. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei NirF aus *P. aeruginosa* um ein cytoplasma-



tisches Protein handelt. Zeitgleich zu dieser Arbeit stellten Remans *et al.* (2010) aufgrund von bioinformatischen Analysen die These auf, dass es sich bei NirF um ein membranständiges Lipoprotein handeln könnte. Der N-terminale Bereich des Proteins weist eine Lipobox (1.3.3) mit der Sequenz LAGC (Winsor *et al.*, 2011) auf, wobei die Sortierungssequenz SQQP das Protein zur periplasmatischen Seite der inneren Membran von *P. aeruginosa* dirigieren sollte (Remans *et al.*, 2010). Bisher ist allerdings noch kein experimenteller Nachweis hierfür erfolgt. Dennoch steht diese bioinformatische Analyse mit Erkenntnissen über die homologe NirF aus *Pa. pantotrophus* in Einklang, da sich die NirF in diesem Bakterium als Protein des Periplasmas nachweisen ließ (Bali *et al.*, 2010). Die Studie von Bali *et al.* (2010) zeigte darüber hinaus, dass die NirF *in vitro* in der Lage ist Häm  $d_1$  zu binden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Histidin 41 von NirF aus *Pa. pantotrophus* an der Bindung sowie der Produktion von Häm  $d_1$  beteiligt sein muss (Bali *et al.*, 2010). Dennoch konnten bisher nur Vermutungen über die Rolle der NirF in der Häm  $d_1$ -Biosynthese aufgestellt werden. So nimmt man an, dass NirF allein durch die Lokalisierung im Periplasma das letzte Enzym der Reaktionskaskade sein sollte (Bali *et al.*, 2011). Weiterhin wird vermutet, dass NirF die Doppelbindung in die Propionatseitenkette des Rings D an C17 einfügt (Abb. 1.11).

#### 1.4.5 Der Häm $d_1$ -Einbau und das c-Typ Cytochrom NirN

Das Protein NirN wird durch das letzte Gen des *nir*-Operons aus *P. aeruginosa* kodiert. Es stellt ein ca. 54 kDa großes Protein dar, das am N-terminalen Ende eine Aminosäuresignalsequenz aufweist, die das Protein durch das Sec-Transportsystem ins Periplasma ausschleust (1.3.2.1) (Hasegawa *et al.*, 2001). Dies konnte bereits für die homologe NirN aus *Pa. pantotrophus* gezeigt werden (Zajicek *et al.*, 2009). Des Weiteren weist NirN ein CxxCH-Motiv zur Häm c-Verknüpfung auf (Hasegawa *et al.*, 2001). Münch konnte 2009 NirN aus *P. aeruginosa* rekombinant in *E. coli* produzieren und zeigen, dass es sich auch hier um ein c-Typ Cytochrom handelt. Zwar weist NirN eine 24-prozentige Aminosäuresequenzidentität zu NirS auf, liegt allerdings im Gegensatz zur NirS als Monomer vor (Münch, 2009). Im Jahr 2009 konnte von Zajicek *et al.* gezeigt werden, dass NirN aus *Pa. pantotrophus* in der Lage ist, Häm  $d_1$  *in vitro* zu binden und auf NirS zu übertragen. Weiterhin wurde beobachtet, dass NirC aus *Pa. pantotrophus* in der Lage ist, ein Elektron auf einen NirN-Häm  $d_1$ -Komplex zu übertragen.

Die Rolle der NirN für die Häm  $d_1$ -Biosynthese bzw. die Reduktion von Nitrit durch die NirS ist weiterhin unklar. Der Phänotyp einer *nirN*-Deletion in *P. aeruginosa* besteht nur in einem schwach verminderten Wachstum und einer reduzierten Nitritreduktaseaktivität (57-

prozentige Aktivität) *in vivo* (Kawasaki *et al.*, 1997). Bislang wurde daher vermutet, dass NirN demnach nicht an der Biosynthese des Kofaktors beteiligt ist, aber als Transporter oder Insertionsprotein für Häm  $d_1$  dienen könnte (Zajicek *et al.*, 2009).

#### 1.4.5.1 Die Maturation der Nitritreduktase

Die Maturation der Nitritreduktase ist in mehrere Schritte zu unterteilen. Zunächst wird das Polypeptid im Cytoplasma von *P. aeruginosa* gebildet. Im Anschluss erfolgt der Export der NirS ins Periplasma. Die N-terminale Signalsequenz der NirS deutet auf einen Transport über den Sec-Komplex hin (Thöny-Meyer & Künzler, 1997). Das Abtrennen der Signalsequenz sollte durch die Signalpeptidase I erfolgen. Im Anschluss sollte der Einbau der beiden Kofaktoren, das Falten des Proteins und die Dimerisierung stattfinden. In welcher Reihenfolge diese Schritte ablaufen ist allerdings unklar. Der Einbau des Häm  $c$  wird durch das Cytochrom  $c$  Maturationssystem I durchgeführt (Thöny-Meyer, 2002). Es wird angenommen, dass NirN eine Rolle bei der Häm  $d_1$  Insertion spielen könnte (Zajicek *et al.*, 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Der Kofaktor Häm  $d_1$  ist ein essenzieller Kofaktor für die Anpassung einiger Mikroorganismen an das Leben unter anaeroben Bedingungen. Dennoch sind viele Fragen bezüglich der Biosynthese des Kofaktors sowie dessen Einbau in die Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase weitestgehend unbeantwortet. So ist beispielsweise nicht klar, welche Proteine des *nir*-Operons von *Pseudomonas aeruginosa* an den letzten Schritten der Häm  $d_1$ -Biosynthese beteiligt sind. Möglicherweise spielt hierbei das Protein NirF eine Rolle, da es eine potentielle Dehydrogenase (Bali *et al.*, 2010) darstellt. In Mutationsstudien zeigte sich, dass dieses Protein für den Ablauf der Nitritreduktion in *P. aeruginosa* essenziell ist, da sonst die Bildung einer aktiven Nitritreduktase ausbleibt (Kawasaki *et al.*, 1997). Des Weiteren ging man anfangs im *P. aeruginosa*-Modell davon aus, dass der Kofaktor vollständig im Cytoplasma synthetisiert werden müsse, bevor ein Transport ins Periplasma erfolgen kann. Ferner sind die dann im Periplasma ablaufenden Prozesse, die zur Insertion des Häm  $d_1$ -Kofaktors in die Nitritreduktase führen, noch vollkommen unklar. Hierbei wird vermutet, dass das *c*-Typ Cytochrom NirN eine Rolle bei dem Einbau des Kofaktors spielen könnte (Zajicek *et al.*, 2009), da eine Deletion des *nirN*-Gens nur ein langsames Wachstum in *P. aeruginosa* hervorruft (Kawasaki *et al.*, 1997) und somit nicht essenziell für die Kofaktorbiosynthese zu sein scheint. Diese Dissertation hat deshalb zum Ziel weitere Einblicke in das System der Häm  $d_1$ -Biosynthese, den Transport des Kofaktors Häm  $d_1$  und die Insertion des Isobacteriochlorins in die Nitritreduktase zu gewinnen.

Zunächst sollte das Protein NirF bioinformatisch auf mögliche Transportsignale überprüft und die Lokalisation des Proteins in *P. aeruginosa* untersucht werden.

Anschließend sollten Produktionssysteme für die Proteine NirF, NirN und NirS, letzteres sowohl in der holo- als auch in der semi-apo-Form, erzeugt werden. Darauf aufbauend sollten grundlegende Methoden etabliert werden, um die Zielproteine chromatographisch zu reinigen. Ko-Reinigungen und Ko-Gelpermeationschromatographien sollten bei der Aufklärung möglicher Interaktionen zwischen diesen Proteinen helfen.

Mit den gereinigten Proteinen NirN und NirS sollten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die zu Western-Blot-Analysen genutzt werden können. Mit den erzeugten Antikörpern sollten Immunopräzipitations- und Ko-Immunopräzipitationsversuche durchgeführt werden, um die mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen NirS, NirN und NirF auch *in vivo* zu untersuchen. *Pull-down*-Analysen von NirF sollten zusätzlich dazu beitragen, die bestehenden Wechselwirkungen besser zu verstehen.

Um unbekannte Interaktionspartner zu finden, sollte die Technik der Immunoaffinitätschro-

matographie etabliert und gezielt nach Interaktionspartnern der Proteine NirN und NirS gesucht werden.

Abschließend sollte untersucht werden, ob das Protein NirN auch an der Häm  $d_1$ -Biosynthese beteiligt sein könnte. Des Weiteren sollte versucht werden das Protein NirN zu kristallisieren, um mehr über dessen Struktur zu erfahren und daraus mögliche Schlüsse für die Bedeutung des *c*-Typ Cytochroms abzuleiten.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel

#### 2.1.1 Geräte

Alle Geräte, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Verwendete Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Mini Sub Cell GT; Maxi Sub Cell GT	Bio-Rad
Autoklav	LVSA 50/70 LVSA	Zirbus
Blotapparatur	TransBlot SD Semidry Transfer Cell	Bio-Rad
Blotapparatur	TurboBlotter	Bio-Rad
Elektroporationsgerät	Elektroporator 2520	Eppendorf
Entgasungsanlage	Vakuumpumpe	Vacuubrand
Falcon-Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf
Filtrationsanlage	Vakuumpumpe	Vacuubrand
FPLC	Äkta Purifier	GE Healthcare
FPLC-Säule	XK 50/30 (Anionenaustauscher)	GE Healthcare
FPLC-Säule	XK 16/40 (Kationenaustauscher)	GE Healthcare
FPLC-Säule	10/300 Superdex 75	GE Healthcare
FPLC-Säule	16/60 Superdex 200	GE Healthcare
French Press	French Pressure Cell Press	Polytec
French Press Zelle	French Pressure Cell	Thermo Scientific
Gefrierschrank	VIP Series -86 °C	Sanyo
Geldokumentationsanlage	DeVision DBox	Decon Science Tec
Kugelmühle	FastPrep-24	MP Biomedicals

Magnetrührer	Combimag	IKA Werke
Multifunktionszentrifuge	Avanti J-26 XP Rotor: JLA 8.100	Beckman Coulter
Nanodrop	ND1000	Peqlab Biotechnology GmbH
pH-Messgerät	CG 842	Schott
Photometer	V-650 UV/Vis Spectrophotometer	Jasco
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Vis Spectrophotometer	GE Healthcare
Pipetten	0.1-2 $\mu$ L; 0.5-10 $\mu$ L; 10-100 $\mu$ L; 100-1000 $\mu$ L; 1-10 mL	Eppendorf
Power Supply	PowerPac300	Bio-Rad
Probenauftragungspumpe	Sample Pump 960	GE Healthcare
Reinstwasseranlage	Milli-Q Synthesis A 10	Millipore
Schüttler	3020	GFL
Schüttler	TR-150	Infors AG
SDS-PAGE-Kammer	Mini Protean III	Bio-Rad
Sonotrode	KE 76	Bandelin
Speed Vac	VacuFuge	Eppendorf
Thermocycler	MyCycler	Bio-Rad
Thermomixer	Thermostat Plus	Eppendorf
Thermomixer	Thermostat Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf
Ultraschall-Aufschlussgerät	Sonoplus UW 2070	Bandelin
Ultraschallbad	Eurolab	Merck
Ultrazentrifuge	L-90K Ultrazentrifuge Rotoren: 45 Ti; Ti 70.1; SW 40 Ti	Beckman Coulter
Vortex	REAX2000	Heidolph
Waage	BP61S	Sartorius
Waage	BL1500	Sartorius
Waage	SBA52	Saltec

### 2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Nicht aufgelistete Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *p.a.* bezogen.

**Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien und Enzyme**

<b>Chemikalien und Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ Maus-IgG AK und $\alpha$ Maus-IgM AK aus Ziege AP Konjugat	Dianova
5-Aminolävulinsäure (ALA)	Sigma-Aldrich
Avidin	IBA
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Merck
Desthiobiotin	IBA
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	Fermentas
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung 37%ig	Roth
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Instant Blue	Biozol
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	GERBU
L-Asparagin	Sigma-Aldrich
6x Loading Dye	Fermentas
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Merck
n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich
Kit for Molecular Weights for GPC	Sigma-Aldrich
Methanol, HPLC Grade	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Page Ruler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
polyklonale Antikörper	Metabion
Ponceau S	Genaxxon
Prescission Protease	Inst. f. Mikrobiologie
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Restriktionsenzyme (alle verwendeten)	New England Biolabs
Rotiphorese Gel 30 (29:1)	Roth
SYPRO Ruby	Invitrogen
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Tween 20	Sigma-Aldrich

### 2.1.3 Hilfsmittel

Alle Hilfsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 2.3: Verwendete Hilfsmittel**

Hilfsmittel	Hersteller
Blotpapier neoLab	neoLab
Glaskörner Ø 70-110 $\mu\text{m}$	Kuhmichel
Glasperlen, Ø 4 mm	Merck
Halb-Mikro Küvette (Polystyrol), 10 mm	Sarstedt
Kristallisationsscreens (alle verwendeten)	QiaGen
Mini-PROTEAN any kD TGX Precast Gel	Bio-Rad
Nitrocellulose Hybond ECL Membran	GE Healthcare
Nitrocellulose O 0.2 $\mu\text{m}$	Merck Millipore
Nitrocellulose O 0.45 $\mu\text{m}$	Merck Millipore
Poly-Prep <sup>®</sup> -Column	Bio-Rad
Präzisionsküvette (Quarzglas) 10 mm	Hellma
Protein A-, Protein G- und Protein L-Agarose	GenScript
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraktion Kit	QiaGen
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	QiaGen
QIAquick <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	QiaGen
Q-Sepharose FastFlow	GE Healthcare
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Roti-PVDF Transfer Membran	Merck Millipore
SP-Sepharose FastFlow	GE Healthcare
Strep-Tactin AP Konjugat	IBA
Strep-Tactin HC FastFlow	IBA
Ultrazentrifugenröhrchen 14 mL	Beckman Coulter
Visking Cellulose, 27/32 in, <14'000 Da	Roth



## 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i>-Stämme</b>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3)</i>	Stratagen
DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>dlacZM15 ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU</i> <i>galK λ<sup>-</sup> rpsL nupG</i>	Invitrogen
ST18	<i>pro thi hsdR<sup>+</sup> Tp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup></i> ; chromosome:: <i>RP4-2</i> Tc:: <i>Mu-Kan::Tn7λpir ΔhemA</i>	Thoma & Schobert (2009)
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i>-Stämme</b>		
PAO1	Wildtyp	Dunn & Holloway (1971)
PAO1 RM301	PAO1 <i>nirF::tet</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (1995)
PAO1 RM361	PAO1 <i>nirN::tet</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (1997)
PAO1 RM488	PAO1 <i>nirS::tet</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (1995)
<b><i>Pseudomonas stutzeri</i>-Stämme</b>		
ZoBell MK202 pUCP-Nir	Sm <sup>r</sup> , <i>nirS::Tn5 Kan<sup>r</sup></i> ; trägt pUCP19 mit <i>nirS</i> aus <i>P. aeruginosa</i> , Amp <sup>r</sup>	Zumft <i>et al.</i> (1988), Arese <i>et al.</i> (2003)

Die *P. aeruginosa*-Stämme PAO1, RM488, RM361 und RM301 werden im Folgenden als wt, Δ*nirS*, Δ*nirN* und Δ*nirF* bezeichnet.

## 2.2.2 Plasmide

Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pEC86	<i>E. coli</i> Plasmid, Clm <sup>r</sup> , trägt <i>ccmA-H</i> Gencluster	Arslan <i>et al.</i> (1998)
pET22b(+)	<i>E. coli</i> Plasmid, Amp <sup>r</sup> , MCS: <i>pelB</i> Signalsequenz N-terminal, <i>his<sub>6</sub></i> C-terminal	Novagen
pET22bnirN	pET22b(+) mit <i>nirN</i> aus <i>P. aeruginosa</i> , (NcoI-BamHI), Amp <sup>r</sup>	Münch (2009)
pET22bStrepII <sub>nirN</sub>	pET22bnirN mit StrepII-Tag Sequenz zwischen <i>pelB-nirN</i> , (zwischen NcoI), Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pET22bnirS	pET22b(+) mit <i>nirS</i> aus <i>P. aeruginosa</i> mit Stop abwärts <i>nirS</i> , (NcoI-HindIII), Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pET22bnirShis <sub>6</sub>	pET22b(+) mit <i>nirS</i> aus <i>P. aeruginosa</i> mit vektorkodierter <i>his<sub>6</sub></i> -Sequenz, (NcoI-HindIII), Amp <sup>r</sup>	Münch (2009)
pMK-RQ- <i>rbpselBnirFPCShis<sub>6</sub></i>	Plasmid mit Codon optimiertem <i>nirF<sub>D.s.</sub></i> -Konstrukt, (NdeI-HindIII), Kan <sup>r</sup>	Life Technologies
pET22bnirF <sub>D.s.</sub> PCShis <sub>6</sub>	pET22b(+) mit Codon-optimierter ( <i>E. coli</i> ) <i>nirF</i> aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> , <i>pelB</i> -Signal, PCS - Proteaseschnittstelle C-term., His <sub>6</sub> C-term., (NdeI- <i>nirF-SpeI-his<sub>6</sub>-BamHI-HindIII</i> ), Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pET22bnirF <sub>D.s.</sub> PCSStrepII	pET22bnirF <sub>D.s.</sub> PCShis <sub>6</sub> mit StrepII-Tag anstatt His <sub>6</sub> -Tag, (SpeI-BamHI), Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pHAP1	pUCP18 mit 9 kb DNA-Fragment aus <i>P. aeruginosa</i> , (PstI-PstI), Amp <sup>r</sup>	Arai <i>et al.</i> (1990)
pJ201_ <i>nirF</i> _OneSTrEP	pJ201_OneSTrEP mit <i>rbs-nirF</i> aus <i>P. aeruginosa</i> , (BamHI-SpeI), Kan <sup>r</sup>	Schnitzer (2011)
pUCP20T	Expression-Shuttle-Vektor <i>E. coli</i> - <i>P. aeruginosa</i> , Amp <sup>r</sup>	Schweizer <i>et al.</i> (1996)
pUCP20T <sub>nirF</sub>	pUCP20TOneSTrEP mit Stop zwischen <i>nirF</i> und OneSTrEP-Tag-Sequenz, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pUCP20T <sub>nirF</sub> OneSTrEP	pUCP20T mit <i>rbs-nirF</i> -OneSTrEP aus pJ201_ <i>nirF</i> _OneSTrEP, (BamHI-SphI), Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pUCP20T <sub>nirF</sub> StrepII	pUCP20TOneSTrEP mit Stop mittig in OneSTrEP-Tag Sequenz, Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit

### 2.2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

**Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide**

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
1	GACCATGGGTAAGGACGACATGAAAG	<i>nirS</i> fw, - Signalsequenz ( <i>NcoI</i> )
2	GTAAGCTTCAGTACACGTGCTGGG	<i>nirS</i> rev, + Stop( <i>HindIII</i> )
3	TATACCATGGGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA GCTAGCGGCGAAGCGCCGGGGGAAG	<i>strepII</i> <i>nirN</i> fw, ( <i>NcoI</i> , <i>NheI</i> )
4	CGGGATCCTCAGTGCGAGGTTC	<i>nirN</i> rev, ( <i>BamHI</i> )
5	CATCGGATCCAGGAGAGATCGCC	<i>nirF</i> fw, <i>rbs</i> + Signalsequenz ( <i>BamHI</i> )
6	CATCACTAGTGAGTCCGATGTGCTGGG	<i>nirF</i> rev, - Stop ( <i>SpeI</i> )
7	CATCGCATGTCTACTACTTCTCGAACTG	<i>nirFOneSTrEP</i> rev, ( <i>SphI</i> )
8	GTGCGGCCGCAAGCTTCTAGAGTCCGATGTGCTGG	QuikChange <i>nirF</i> fw, fügt Stop ein
9	CCAGCACATCGGACTCTAGAAGCTTGCGGCCGCAC	QuikChange <i>nirF</i> rev, fügt Stop ein
10	GCCGCCGGAGCCGCCCTACTTCTCGAACTGGGG	QuikChange <i>StrepII</i> fw, verkürzt OneSTrEP- zu StrepII-Tag
11	CCCCAGTTCGAGAAGTAGGGCGGCTCCGGCGGC	QuikChange <i>StrepII</i> rev, verkürzt OneSTrEP- zu StrepII-Tag
12	CTAGTGGCGGCATCGAGGGCCGCGGCGGCGGGCT CCGCCTGGTCCCACCCCCAGTTCGAGAAGGGCGGGCG GCTCCGGCGGCGGCTCCGGCGGCTCCGCCTGGTCCC ACCCCCAGTTCGAGAAGTAGTGA CTGAGGCATG	Insert OneSTrEP-Tag fw, ( <i>SpeI</i> , <i>SphI</i> )
13	CCTCGAGTCACTACTTCTCGAACTGGGGGTGGGACC AGGCGGAGCCGCGGAGCCGCCGCGGAGCCGCCGC CCTTCTCGAACTGGGGGTGGGACCAGGCGGAGCCGC CGCCGCCGCGGCCCTCGATGCCGCCA	Insert OneSTrEP-Tag rev, ( <i>SpeI</i> , <i>SphI</i> )
14	CTAGTAGCGCTTGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAG	Insert StrepII-Tag fw, ( <i>SpeI</i> , <i>BamHI</i> )
15	GATCCTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTA	Insert StrepII-Tag rev, ( <i>BamHI</i> , <i>SpeI</i> )

## 2.3 Medien und Medienzusätze

### 2.3.1 Medien

Alle Kulturmedien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Zur Kultivierung auf Festkulturmedien wurden 1.5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Sterilisation erfolgte entsprechend 2.4.1.

#### 2.3.1.1 LB-Medium

Dieses Grundmedium wurde als Festmedium zur Zellkultivierung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp., sowie als Flüssigmedium zur Zellkultivierung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp. für Plasmidisolierungen, Kultivierungen zur Proteinproduktion und Herstellung von Glycerinkulturen genutzt.

**LB-Medium** (Sambrook & Russel, 2001)

Trypton aus Casein	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

#### 2.3.1.2 TB-Medium

Dieses Medium wurde als Proteinproduktionsmedium für *E. coli* verwendet.

**TB-Medium** (Sambrook & Russel, 2001)

Trypton aus Casein	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerin	4 mL/L

Nach dem Autoklavieren wurde dem abgekühlten Medium 0.1 Volumen einer sterilen 0.89 M Kaliumhydrogenphosphat-Puffer zugegeben:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.72 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17 M

#### 2.3.1.3 Autoinduzierendes Medium

Dieses Medium wurde als Proteinproduktionsmedium für *E. coli* verwendet. Aufgrund der vorhandenen Mengen an Glucose und Lactose erfolgt eine Induktion der Zielgenexpression in diesem Medium ohne weitere Zugabe eines Medienzusatzes.

**ZYM-5052-Medium** (Studier, 2005)

Trypton aus Casein	10	g/L
Hefeextrakt	5	g/L

Nach dem Autoklavieren wurden dem abgekühlten Medium 40 mL/L 25x M-Lösung, 20 mL/L 50x 5'052-Lösung, 1 mL/L Magnesiumsulfatlösung, sowie 1 mL/L 1'000x TMM-Lösung hinzugegeben:

25x M-Lösung:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.625	M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.625	M
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.25	M
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.125	M

Die Lösung wurde autoklaviert.

50x 5'052-Lösung:

Glycerin	250	g/L
Glucose	25	g/L
Lactose-Monohydrat	100	g/L

Diese Lösung wurde sterilfiltriert.

Magnesiumsulfatlösung:

$\text{MgSO}_4$	1	M
-----------------	---	---

Diese Lösung wurde autoklaviert.

1'000x TMM-Lösung:

$\text{FeCl}_3$	50	mM
$\text{CaCl}_2$	20	mM
$\text{MnCl}_2$	10	mM
$\text{ZnSO}_4$	10	mM
$\text{CoCl}_2$	10	mM
$\text{CuCl}_2$	2	mM
$\text{NiCl}_2$	2	mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	2	mM
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2	mM
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2	mM

Die Salze wurden durch Einstellen auf 60 mM HCl gelöst und sterilfiltriert.

### 2.3.1.4 AC-Medium

Dieses Medium wurde als Produktionsmedium für *Pseudomonas stutzeri* verwendet.

**AC-Medium** (Arese *et al.*, 2003)

L-Asparagin	2 g/L
Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O	7 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2 g/L
NaCl	20 g/L

Nach dem Autoklavieren wurde dem abgekühlten Medium 1 mL/L einer sterilen 1000x TMM-Lösung (Studier, 2005) zugesetzt.

### 2.3.2 Medienzusätze

Die Medien wurden zu Selektionszwecken oder zur Induktion der Zielgenexpression mit sterilen Medienzusätzen versetzt. Die Zugabe - analog zu Tabelle 2.7 - erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen unter 50 °C.

**Tabelle 2.7: Antibiotika und Medienzusätze**

Zusatz	Lösungsmittel	c <sub>A</sub>	c <sub>E</sub>	Stamm
ALA	dest. Wasser	75 mg/mL	75 µg/mL	<i>E. coli</i>
		200 mM	0.2 mM	<i>Pseudomonas</i>
Carbenicillin	dest. Wasser	100 mg/mL	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
			250 µg/mL	<i>Pseudomonas</i>
Chloramphenicol	Ethanol	34 mg/mL	34 µg/mL	<i>E. coli</i>
IPTG	dest. Wasser	0.5 M	25 µM	<i>E. coli</i>
			1 mM	<i>Pseudomonas</i>
Kanamycin	dest. Wasser	30 mg/mL	10 µg/mL	<i>E. coli</i>
			30 µg/mL	<i>Pseudomonas</i>
KNO <sub>3</sub>	dest. Wasser	1 M	1.2 g/L	<i>Pseudomonas</i>
NaNO <sub>2</sub>	dest. Wasser	1 M	10 mM	<i>Pseudomonas</i>
NaNO <sub>3</sub>	dest. Wasser	1 M	50 mM	<i>Pseudomonas</i>
Piperacillin	dest. Wasser	50 mg/mL	50 µg/mL	<i>Pseudomonas</i>
Streptomycin	dest. Wasser	75 mg/mL	75 µg/mL	<i>Pseudomonas</i>
Tetracyclin	Ethanol (50 %, v/v)	10 mg/mL	80 µg/mL	<i>Pseudomonas</i>

## 2.4 Mikrobiologische Techniken

### 2.4.1 Sterilisation

Alle verwendeten Medien, Lösungen, Gefäße und Materialien wurden bei 121 °C und 2 bar für 20 min dampfsterilisiert. Vor der Entsorgung wurden verwendete Mikroorganismen separat auf die gleiche Weise autoklaviert. Hitzeinstabile Medienzusätze oder Spurenelementlösungen sowie Antibiotika wurden durch Filtrieren über einen Membranfilter (0.2 µm Porengröße) sterilisiert.

### 2.4.2 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung von Bakterien wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden ausschließlich sterile Medien, Lösungen und Gefäße verwendet.

#### Kultivierung auf Festmedien:

Das Kultivieren von Bakterien auf LB-Agar-Platten erfolgte entweder nach Vereinzelung durch 13-Strich-Methode mit einer ausgeglühten Impföse oder - im Zuge der Transformation - durch Verteilen von Bakteriensuspension durch Ausrollen mit sterilen Glasperlen. Bei Bedarf wurden dem Nährmedium entsprechende Antibiotika sowie benötigte Medienzusätze zugegeben. Die Inkubation inokulierter Platten erfolgte anschließend im Falle von *E. coli* und *P. aeruginosa* bei 37 °C oder im Falle von *P. stutzeri* bei 30 °C jeweils über Nacht (ü.N.) im Dunkeln.

#### Kultivierung in Flüssigkulturen:

Flüssigkulturen für Plasmidpräparationen wurden mit einer sterilen Impföse entweder aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von LB-Agar-Platten inokuliert.

Flüssigkulturen als Vorkultur für Glycerin- oder Produktionskulturen wurden mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte und einer sterilen Impföse inokuliert. Die Inkubation dieser Vorkulturen erfolgte bei Bedarf unter Zugabe von Antibiotika und Medienzusätzen bei 37 °C (*E. coli* und *P. aeruginosa*) oder bei 30 °C (*P. stutzeri*) ü.N. im Dunkeln unter Schütteln mit 180-200 rpm. Vorkulturen mit Volumen bis 8 mL wurden in Kulturröhrchen hergestellt. Für Vorkulturen mit größerem Volumen wurden entsprechende Erlenmeyerkolben mit Schikane genutzt. Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:100 mit Vorkulturen inokuliert.

Anaerobe Kultivierung von *P. aeruginosa* erfolgte unter Zugabe von entsprechenden Antibiotika und Medienzusätzen (Nitrat oder Nitrit) in Gefäßen, die mit Butylsepten verschlossen waren, bei 37 °C und 120-140 rpm im Dunkeln.

### 2.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm ( $OD_{578}$ ) in einem UV/Vis-Spektrophotometer Ultrospec 2000 (GE Healthcare, München, Deutschland) bestimmt. Bei einer  $OD_{578} \geq 1$  wurde die Suspension mit dem eingesetzten Kulturmedium verdünnt. Eine  $OD_{578} = 1$  entspricht etwa einer Zellzahl von  $10^9$  Zellen/mL Kultur.

### 2.4.4 Lagerung von Bakterien

Die Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte für kurze Zeiträume auf mit Parafilm verschlossenen LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika und Medienzusätzen bei 4 °C im Dunkeln. Dauerhafte Lagerung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen bei -80 °C. Hierzu wurden 800  $\mu$ L einer ü.N.-Kultur mit 400  $\mu$ L einer 80%igen (v/v) Glycerinlösung vermischt und bei -80 °C eingefroren.

## 2.5 Molekularbiologische Techniken

### 2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 2-4 mL einer Übernachtskultur durch Zentrifugation bei  $16'100 \times g$  sedimentiert. Der Medienüberstand wurde entfernt und die Zellen entweder mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit (QiaGen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben weiterverarbeitet oder nachfolgenden Schritten unterzogen (verändert nach Birnboim & Doly, 1979).

Die sedimentierten Zellen wurden in 300  $\mu$ L Lösung-1 gründlich resuspendiert und anschließend mit 300  $\mu$ L Lösung-2 versetzt. Nach mehrfachem vorsichtigen Invertieren wurden der Lösung 300  $\mu$ L Lösung-3 zugegeben und erneut mehrfach invertiert. Zur Trennung der Plasmid-DNA von Zellresten und denaturierten Proteinen wurde der Ansatz für 30 min bei  $16'100 \times g$  zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600  $\mu$ L Isopropanol versetzt werden. Durch erneute Zentrifugation ( $16'100 \times g$ , 30 min) wurde die Plasmid-DNA präzipitiert und vom Überstand befreit. Das gewonnene Plasmid-DNA-Präzipitat wurde mit 400  $\mu$ L einer 70%igen (v/v) Ethanollösung vorsichtig ein- bis dreimal gewaschen. Um den Alkohol vollständig zu entfernen wurde der Ansatz für ca. 25 min bei 37 °C getrocknet und die Plasmid-DNA anschließend in 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung von isolierter Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

<b>Lösung-1</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 $\mu$ g/mL



<b>Lösung-2</b>	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
<b>Lösung-3</b>	Kaliumacetat, pH 5.5	3 M

## 2.5.2 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen

Zur Herstellung und Transformation von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden verschiedene Techniken genutzt. Während das Einbringen von Plasmid-DNA in *E. coli* durch Transformation von chemokompetenten Zellen erfolgte, wurden *P. aeruginosa*-Zellen durch Elektroporation transformiert.

### 2.5.2.1 Erzeugung von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter Zellen wurden zunächst *E. coli*-Zellen in 100 mL LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0.5 kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis gekühlt. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 2'900 \* g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die geernteten Zellen wurden vorsichtig in 10 mL einer sterilen CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 10 % (w/v) Glycerin) resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen analog zum ersten Zentrifugationsschritt pelletiert. Nachdem der Überstand ein weiteres Mal entfernt wurde, konnten das Zellpellet in 1 mL der CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und zu 50 µL Portionen in sterile Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert werden. Zur Lagerung wurden die portionierten Zellsuspensionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -80 °C gelagert.

### 2.5.2.2 Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde eine Portion (2.5.2.1) der chemokompetenten *E. coli*-Zellen mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt und für 20 min auf Eis gestellt. Nachdem der Ansatz für 1 min einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt wurde, folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden dem Ansatz 450 µL steriles LB-Medium sowie nötige Medienzusätze hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C im Thermomixer bei 400 rpm geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Ansätzen zu 50, 100 und 250 µL auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika und gegebenenfalls nötigen Medienzusätzen mit Glasperlen (2.4.2) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

### 2.5.2.3 Erzeugung von elektrokompetenten *P. aeruginosa*-Zellen

Zur Erzeugung von elektrokompetenten *P. aeruginosa*-Zellen (verändert nach Choi *et al.*, 2006) wurden zunächst LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika mit Zellen aus ei-

ner Glycerinkultur so inokuliert, dass nach Wachstum ü.N. bei 37 °C ein bakterieller Biofilm entstand. Dieser Biofilm wurde am Folgetag mit einer sterilen Impföse von der Platte abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß, das 1 mL einer 0.3 M sterilen Saccharose-Lösung enthielt, überführt. Die so gewonnen Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und anschließend für 2 min bei 16'100 \* g pelletiert. Zwei nachfolgende Waschschrirte mit jeweils 1 mL Saccharose-Lösung, gefolgt von erneutem Zentrifugieren, erzeugten zur Elektroporation einsetzbare *P. aeruginosa*-Zellen. Zuletzt wurde das Bakterienpellet in 500 µL Saccharose-Lösung resuspendiert und zu 100 µL Einheiten aliquotiert.

#### 2.5.2.4 Elektroporation von *P. aeruginosa*-Zellen

Die zur Elektroporation gewaschenen und resuspendierten *P. aeruginosa*-Zellen wurden in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und mit 1 µL einer Plasmid-DNA-haltigen Lösung für 20 min auf Eis inkubiert. Bevor die gefüllte Küvette in das Elektroporationsgerät eingestellt wurde, mussten die Kontakte der Küvette von Wasser befreit werden. Zur Elektroporation wurde anschließend eine Spannung von 2.5 kV (200 Ω, 25 µF) am Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angelegt (Choi *et al.*, 2006). Nach dem akustischen Signal wurden die Zellen sofort mit 1 mL sterilem LB-Medium vermischt. Daraufhin konnten die Zellen für 45 min bei 37 °C im Thermomixer bei 400 rpm inkubiert werden, bevor sie auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechenden Antibiotika zu 200 und 500 µL ausplattiert wurden.

#### 2.5.3 Biparentales Mating

Sofern Plasmid-DNA nicht durch Elektroporation in *P. aeruginosa* eingebracht werden konnte, erfolgte dies durch biparentales Mating. Hierzu wurde *E. coli* ST18 als Donorstamm (Thoma & Schobert, 2009) mit dem Zielplasmid analog zu 2.5.2.2 transformiert. Ein Milliliter einer ü.N.-Kultur dieses erzeugten *E. coli* ST18-Stamms wurden mit 100 µL einer *P. aeruginosa* (Akzeptorstamm) ü.N.-Kultur vermischt. Der Medienüberstand wurde nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 16'100 \* g abgenommen. Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µL LB-Medium mit 75 µg/mL ALA resuspendiert und komplett als Tropfen auf eine LB-Agar-Platte (versetzt mit 75 µg/mL ALA) überführt. Die anschließende Inkubation der inokulierten LB-Agar-Platte erfolgte zunächst für 1 h bei RT und für 5 h bei 37 °C im Dunkeln. Nach sechs Stunden Inkubationszeit wurde eine sterile Impföse einmal durch den tropfenförmigen Bakterienrasen geführt. Die hierbei aufgenommenen Zellen wurden mit der Impföse auf frischen LB-Agar-Platten ohne ALA-Zusatz aber mit entsprechenden Antibiotika vereinzelt (2.4.2). Der Rest des Bakterienrasens wurde anschließend mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 100 µL sterilem LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit den zur Selektion erforderlichen Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation der inokulierten Medienplatten erfolgte mindestens ü.N. bei 37 °C im Dunkeln. Diese Zeit wurde bei Bedarf verlängert, sofern mehrere Antibiotika im Medium enthalten waren, die die Wachstumsgeschwindigkeit des

erzeugten *P. aeruginosa*-Stamms verlangsamen. Erhaltene Einzelkolonien wurden analog zu 2.5.2.2 weiterverarbeitet.

### 2.5.4 DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurden auf Richtigkeit ihrer Inserts überprüft. Dies erfolgte durch DNA-Sequenzierung durchgeführt von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland). Hierzu wurde die zu überprüfende DNA zuvor mittels des QIAquick PCR-Purification Kits der Firma QiaGen (Hilden, Deutschland) gereinigt. Erhaltene Sequenzen wurden mit der Software SeqMan Pro (DNA Star Lasergene, Madison, USA) ausgewertet.

### 2.5.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop ND1000 Spektrometers (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland). Dazu wurden die Absorptionen von 1-2  $\mu\text{L}$  der DNA-haltigen Lösungen bei Wellenlängen von 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) gemessen. Eine  $A_{260}$  von 1 entspricht ca. 50  $\mu\text{g/mL}$  doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA-Lösung konnte durch den Quotienten von  $A_{260}/A_{280}$  überprüft werden. Eine nahezu proteinfreie Lösung wies hierbei einen Quotienten von ca. 1.8 bis 2 auf.

### 2.5.6 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente dazu, Gene zu amplifizieren und sie durch die Wahl der Primerüberhänge so zu funktionalisieren, dass sie von Restriktionsenzymen erkannt wurden. Als Templat diente, sofern nicht anders beschrieben, 5-25 ng Plasmid-DNA. Benutzte Primer (0.5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) enthielten in der Regel 12-18 Nukleotide, die komplementär zum Templat waren, sowie einen zum 5'-Ende nicht-komplementären Bereich, der Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen enthielt und einen Überhang von 3-4 Nukleobasen aufwies. Jeder PCR-Ansatz enthielt 200  $\mu\text{M}$  jedes Desoxyribonukleotids sowie 1  $\mu\text{L}$  Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Gesamtvolumen eines Standard-PCR-Ansatzes war 25  $\mu\text{L}$  inklusive 1  $\mu\text{L}$  Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) oder 1  $\mu\text{L}$  Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) und der benötigten Menge der entsprechenden Puffersysteme der Polymerasen (siehe Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.8: Pipettierschema der PCR**

Bestandteil (Konz.)	Menge
Templat	5-25 ng
Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
dNTP-Lösung (10 mM)	0.5 $\mu$ L
DMSO	1 $\mu$ L
DNA-Polymerasepuffer (5x)	5 $\mu$ L
DNA-Polymerase	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 25 $\mu$ L

Der PCR-Ansatz wurde einem Temperaturprofil (siehe Tabelle 2.9) unterzogen, das zunächst die doppelsträngige DNA (dsDNA) bei 95-98 °C für 300 s denaturierte. Anschließend folgten 30 Wiederholungen von den in Tabelle 2.9 beschriebenen Schritten 2-4. Hierbei wurde zunächst für 15 s auf 95-98 °C erhitzt zur erneuten Denaturierung der dsDNA, nach Abkühlen auf 55-72 °C für 30 s erfolgte die Anlagerung der Primer (*Annealing*). Der Elongationsschritt wurde bei 72 °C durchgeführt und war abhängig von der Länge des zu erzeugenden Amplifikats, weshalb Zeiten zwischen 45 und 90 s eingesetzt wurden.

**Tabelle 2.9: Temperaprofil der PCR**

Nummer	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
1	Denaturierung	95-98	300	1
2	Denaturierung	95-98	15	30
3	Annealing	55-72	30	30
4	Elongation	72	45-90	30
5	Elongation	72	600	1
6	Kühlung	4	$\infty$	1

Die abschließenden Schritte waren eine endgültige Elongation bei 72 °C für 600 s und Kühlen auf 4 °C zur kurzzeitigen Lagerung. Die PCR-Ansätze wurden entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in der Agarose-Gelelektrophorese (2.5.10) weiterverarbeitet, um das gewünschte DNA-Amplifikat von Hintergrund zu trennen und aus dem Gel zu isolieren.

### 2.5.7 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Die Kolonie-PCR wurde dazu eingesetzt eine größere Anzahl an Klonen auf Einbau eines Inserts nach der Klonierung zu testen. Hierbei wird im Gegensatz zur konventionellen PCR nicht gereinigte Plasmid-DNA als Templat benutzt, sondern eine Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 10  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Von der so erhaltenen Bakteriensuspension werden 0.5-1  $\mu\text{L}$  als Templat für die PCR eingesetzt. Hierbei gilt, dass nicht zu viel Templat eingesetzt werden darf, da dies für die Reaktion hinderlich ist. Durch Vereinigung von mehreren Templatansätzen können so schnell hohe Anzahlen an Klonen gescreent werden. Der PCR Ansatz entspricht dem in Tabelle 2.8 (2.5.6) aufgeführten, lediglich das Templat wurde wie oben beschrieben gewählt. Das in Tabelle 2.9 (2.5.6) beschriebene Temperaturprofil wurde ebenfalls für diese Methode genutzt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.5.10) ausgewertet. Positive Klone wurden als ü.N.-Kulturen zur Durchführung von Plasmidpräparationen (2.5.1) kultiviert.

### 2.5.8 Einführung von Punktmutationen mittels ortsspezifischer Mutagenese

Zur punktuellen Veränderungen von Nukleobasen oder gesamten Codons in Zielgenen wurde die ortsspezifische Mutagenese angewandt. Hierzu diente das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Dabei wird die *PfuUltra* HF DNA-Polymerase eingesetzt, um einen kompletten Plasmidstrang zu amplifizieren. Der PCR-Ansatz richtete sich hierbei nach den Empfehlungen des Herstellers und entsprach dem Pipettierschema der Tabelle 2.10.

**Tabelle 2.10: Pipettierschema der ortsspezifischen Mutagenese**

Bestandteil (Konz.)	Menge
Templat-Plasmid	1-10 ng pro Ansatz
Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5 $\mu\text{L}$
Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5 $\mu\text{L}$
dNTP-Lösung (10 mM)	0.5 $\mu\text{L}$
DNA-Polymerasepuffer (10x)	2.5 $\mu\text{L}$
<i>PfuUltra</i> HF DNA-Polymerase	0.5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	ad 17,5 $\mu\text{L}$

Das Temperaturprofil erforderte einen Elongationsschritt von 7 min, um die Amplifikation des gesamten Plasmids zu gewährleisten. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 2.11 dargestellt.

**Tabelle 2.11: Temperaturprofil der ortsspezifischen Mutagenese**

Nummer	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklenzahl
1	Denaturierung	95	1	1
2	Denaturierung	95	1	25
3	Annealing	55	1	25
4	Elongation	68	7	25
5	Elongation	68	8	1
6	Kühlung	4	∞	1

Nach der durchgeführten PCR folgte der Abbau der Templat-DNA durch einen *DpnI*-Verdau (Verdau der methylierten DNA). Dieser Schritt richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Das so erhaltene mutierte Plasmid wurde, wie unter Punkt 2.5.2.2 dargestellt, durch Einsatz verschiedener Volumina (2, 5 und 10  $\mu$ L) von Plasmidlösung in *E. coli* DH10B transformiert und weiterverarbeitet.

## 2.5.9 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von amplifizierter DNA sowie Plasmiden erfolgte durch Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA). Hierbei wurden die Reaktionsansätze so gewählt, dass sie den Angaben des Herstellers im Bezug auf Konzentration der DNA, der Menge der Nukleasen, dem entsprechenden Puffersystem sowie den erforderlichen Temperaturoptima der jeweilig genutzten Enzyme entsprachen. Die Dauer der Restriktionen lag bei analytischem Verdau bei max. 1 h, während für präparative Spaltungen 2-3 h gewählt wurden. Der Erfolg der Restriktionen wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.5.10) überprüft.

## 2.5.10 Trennung von DNA-Fragmenten mittels

### Agarose-Gelelektrophorese

Amplifizierte DNA oder linearisierte Plasmide, sowie Inserts nach dem Restriktionsverdau wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden die jeweiligen Proben mit entsprechenden Mengen 6x Loading-Dye (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland) versetzt und auf eine Agarosegel (0.7-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer) appliziert. Nachdem das Gel mit TAE-Puffer überschichtet wurde, verlief die Trennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe durch 30-45-minütiges Anlegen einer Spannung von 90-120 V. Zur Visualisierung wurde das Gel für 15 min in eine 0.1%ige (v/v) Ethidiumbromidlösung gelegt. Anschließend konnten die DNA-Banden durch eingelagertes Ethidiumbromid durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und digital dokumentiert werden.

<b>TAE-Puffer</b>	Tris-Acetat, pH 8.0	40 mM
	EDTA	1 mM
<b>6x Loading Dye</b>	Bromphenolblau	350 $\mu$ M
	XylenCyanol FF	450 $\mu$ M
	Glycerin	50 % (w/v)
<b>Agarosegel (0.7-2 %)</b>	Agarose	0.7-2 g
	TAE-Puffer	100 mL
	zum Lösen aufkochen	
<b>Ethidiumbromidlösung</b>	Ethidiumbromid	0.1 mL
	H <sub>2</sub> O	100 mL

### 2.5.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach der Trennung in einem Agarosegel wurden die erhaltenen Zielbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden im Anschluss mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (QiaGen, Hilden, Deutschland) analog zu den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die so gereinigte DNA konnte zur Ligation eingesetzt werden.

### 2.5.12 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA (linearisierte Vektoren und Insert) erfolgte unter Zuhilfenahme des Rapid DNA Ligation Kits der Firma Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland). Hierbei wurden die vom Hersteller angegebenen Mengen an DNA-Ligase, Ligationspuffer und DNA verwendet. Die eingesetzten Mengen von Insert und Vektor richteten sich weiterhin nach dem Konzentrationsverhältnis von 3:1 (Insert zu Vektor). Zur Transformation wurden pro Zellsuspensionsportion (2.5.2.2) 7  $\mu$ L Ligationsansatz eingesetzt.

#### 2.5.12.1 Oligonukleotide als Insert für die Ligation

Die in Tabelle 2.6 angegebenen Oligonukleotide Nr. 12, 13, 14 und 15 wurden direkt als Insert für eine Ligation mit entsprechend linearisierten Vektoren eingesetzt. Hierzu mussten die Oligonukleotide zunächst phosphoryliert werden. Dies geschah durch Einsatz der T4-Polynukleotidkinase der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA) wie in Tabelle 2.12 beschrieben.

Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert bevor er für 20 min bei 65 °C abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Oligonukleotide hybridisiert. Hierzu wurden ver-

**Tabelle 2.12: Pipettierschema der Oligonukleotidphosphorylierung**

Bestandteil (Konz.)	Menge
Oligonukleotid (100 pmol/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
T4-Polynukleotidkinase (10 U)	1 $\mu$ L
T4-DNA Ligasepuffer mit ATP (10x)	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L

einigte Ansätze von Oligos 12/13 oder 14/15 zunächst auf 99 °C im Thermomixer erhitzt und für 10 min inkubiert, um gegebenenfalls auftretende Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde der Thermomixer zum Abkühlen auf RT ausgeschaltet. Die Reaktionsansätze verblieben während der nächsten 2 h im Thermomixer, um ein langsames Abkühlen und damit einhergehendes Hybridisieren der komplementären Oligonukleotidbereiche zu gewährleisten. Die so erzeugten doppelsträngigen DNA-Moleküle konnten in der Ligation (2.5.12) als Inserts in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000) eingesetzt werden.

## 2.6 Bearbeitung von Zellmembranen

### 2.6.1 Herstellung eines zellfreien Extrakts zur Zellmembranpräparation

Zur Gewinnung und Trennung von bakteriellen Membranen mussten zunächst zellfreie Extrakte hergestellt werden. Dazu wurde ein geerntetes *P. aeruginosa*-Pellet im Verhältnis 5:1 „Puffer zu Pellet“, Verhältnis Volumen Puffer in Milliliter zu Nasszellgewicht des Bakterienpellets in Gramm (P/P), aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit der French-Press (ca. 19'200 p.s.i.) aufgeschlossen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde in einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C mit 20'000 \* g von Zelltrümmern (zur späteren Membrantrennung) befreit oder bei 47'000 \* g für 20 min zusätzlich von Proteinaggregaten getrennt (verändert nach Schauer *et al.*, 2003). Die erzeugten Überstände konnten wie nachfolgend beschrieben zur Anreicherung von Zellmembranen genutzt werden.

### 2.6.2 Gewinnung der Gesamtzellmembran

Zur Gewinnung der gesamten Membran von *P. aeruginosa* wurde zunächst ein zellfreier Extrakt in Cyd-Puffer (Möbius, 2008) hergestellt (2.6.1). Der zellfreie Extrakt wurde anschließend für 1 h bei 4 °C und 100'000 \* g zentrifugiert. Dabei wurde die Gesamtzellmembranfraktion sedimentiert, von der eine Probe für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE - 2.8.2) genommen werden konnte. Um die Proteine aus der



Membran zu solubilisieren wurden Detergenzien enthaltende Puffer verwendet (Ko-IP-Puffer verändert nach Lüer *et al.*, 2005; Puffer-F nach Möbius, 2008) und für 2 h bei 4 °C und leichtem Rühren mit den Membranen in Kontakt gebracht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 h bei 100'000 \* g und 4 °C wurden der erhaltene Überstand vom Sediment getrennt und beides in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Der Überstand konnte weiterhin genutzt werden, um Zielproteine anzureichern.

<b>Cyd-Puffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	EDTA	15 mM
	Complete protease inhibitor cocktail EDTA-free	1x à 10 mL
	(Möbius, 2008)	
<b>Ko-IP-Puffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	0.5 % (v/v)
	Na-Deoxycholat	0.5 % (w/v)
	n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	0.5 % (w/v)
	EDTA	5 mM
	(verändert nach Lüer <i>et al.</i> , 2005)	
<b>Puffer-F</b>	Tris-HCl, pH 6.8	75 mM
	KCl	150 mM
	Chaps	10 mM
	EDTA	5 mM
	(Möbius, 2008)	

### 2.6.3 Isopyknische Gradientenzentrifugation

Zur Trennung der inneren und äußeren Membran von *P. aeruginosa* wurde eine isopyknische Saccharose Gradienten Zentrifugation durchgeführt (verändert nach Magnowska 2010). Hierzu wurde ein zellfreier *P. aeruginosa*-Extrakt (ca. 4 mL) mit Membran-Aufschlusspuffer hergestellt und auf einen dreistufigen Saccharose-Gradienten in Ultrazentrifugenröhrchen (14 mL, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) für einen SW 40 Ti Rotor (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) geschichtet. Dieser dreistufige Gradient bestand zunächst aus einer 3-mL-Schicht einer 2 M Saccharose-Lösung. Darauf befand sich eine Schicht aus 3 mL einer 1.5 M Saccharose-Lösung. Abgeschlossen wurden diese Schichten durch 3 mL einer 0.5 M Saccharose-Lösung. Der so aufgebaute Dichtegradient konnte anschließend für 1 h bei 100'000 \* g und 4 °C im SW 40 Ti-Rotor zentrifugiert werden. Die erhaltenen Banden für innere und äußere bakterielle Membran wurden mit einer Pasteurpipette zwischen den Saccharose-Schichten entnommen. Zur Vermeidung von Verunreinigungen wurden die

Membranen getrennt voneinander mit Membran-Aufschlusspuffer verdünnt und einer wiederholten isopyknischen Gradientenzentrifugation unterzogen. Die so getrennten Fraktionen der inneren und äußeren Membran wurden einer SDS-PAGE (2.8.2) unterzogen und mittels Western-Blot (2.8.3) auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht.

<b>Membran-Aufschlusspuffer</b>	Kaliumacetat	100 mM
	Magnesiumacetat	5 mM
	Hepes, pH 7.5	50 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	0.05 % (v/v)
	Complete protease inhibitor	
	cocktail EDTA-free	1x à 10 mL
	(Magnowska, 2010)	

## 2.7 Proteinbiochemische Techniken

### 2.7.1 Produktion der Zielproteine

#### 2.7.1.1 Produktion von holo-NirS

Die rekombinante Produktion der holo Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase (hNirS) aus *P. aeruginosa* in *P. stutzeri* wurde wie von Schnitzer (2011) beschrieben (verändert nach Arese *et al.*, 2003) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine 1 L-Vorkultur LB-Medium mit *P. stutzeri* ZoBell MK202 pUCP-Nir inokuliert und ü.N. bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die anschließenden Hauptkulturen - 1 L in 2-L-Erlenmeyerkolben - in AC-Medium wurden zunächst 1:10 mit Vorkultur inokuliert und schließlich bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0.6 kultiviert. Nach Erreichen dieser optischen Dichte wurden jeweils die Inhalte zweier 2-L-Erlenmeyerkolben vereinigt, sodass die weitere Inkubation unter mikroaeroben Bedingungen verlief. Zugleich wurde der vereinigten Zellsuspension zur Induktion der Zielgenexpression 1 mM IPTG zugesetzt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 1.2 g/L Kaliumnitrat als Energiequelle unter anaeroben Bedingungen und Induktor der Häm *d*<sub>1</sub>-Biosynthese, sowie 0.2 mM ALA zur Unterstützung der Häm *c*- und Häm *d*<sub>1</sub>-Biosynthese. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1.3 bei 120 rpm.

#### 2.7.1.2 Produktion von semi-apo-NirS

Die Produktion der semi-apo-Form der Nitritreduktase NirS (saNirS) erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen. Zum einen wurde saNirS aus *P. aeruginosa* rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) produziert. Zum anderen wurde die Produktion von saNirS in *P. stutzeri* ZoBell MK202 pUCP-Nir durchgeführt.

#### Rekombinante Produktion von semi-apo-NirS in *E. coli*:

Hierzu wurde von *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bnirS eine Vorkultur in LB-Medium ü.N. bei 37 °C bei 200 rpm mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angelegt. Die Hauptkultur wurde in Anlehnung an Studier (2005) in Autoinduktionsmedium kultiviert. Dafür wurde die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 mit Vorkultur inokuliert. Die Produktionskultur wurde dann für 4 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis schließlich ein Temperaturwechsel zu 25 °C für weitere 26 h bei 160 rpm erfolgte. Nach der insgesamt 30-stündigen Kultivierung wurden die Bakterien geerntet.

Eine Testproduktion von NirSHis<sub>6</sub> in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bnirShis<sub>6</sub> erfolgte nach Münch (2009) in LB-Medium bei 37°C und 200 rpm. Die Induktion der Zielgenexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) bei einer OD<sub>578</sub> von 0.6 gestartet. Anschließend erfolgte die weitere Kultivierung bei 17 °C über Nacht.

#### Rekombinante Produktion von semi-apo-NirS in *P. stutzeri*:

Die rekombinante Produktion von saNirS in *P. stutzeri* erfolgte bis zum Induktionsschritt analog zu den in 2.7.1.1 beschriebenen Bedingungen. Anschließend wurde keine Vereinigung zweier Ansätze herbeigeführt sondern weiter unter aeroben Bedingungen kultiviert. Des Weiteren wurden zur Induktion lediglich IPTG (1 mM) und ALA (0.2 mM) hinzugegeben. Diese veränderten Bedingungen führten dazu, dass die Häm *c*-Biosynthese weiterhin ablaufen konnte, es aber zu keiner Bildung von Häm *d*<sub>1</sub> kam und somit eine Cytochrom *c*-Variante der Nitritreduktase produziert wurde. Die Kultivierung nach Induktion erfolgte ü.N. bei 180 rpm und 30 °C.

### **2.7.1.3 Produktion von NirN**

Die Produktion von NirN erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 entweder mit pET22bnirN oder pET22bStrepII<sub>nirN</sub> analog zu den in 2.7.1.2 beschriebenen Bedingungen zur rekombinanten Produktion von saNirS in *E. coli*.

### **2.7.1.4 Produktion von NirF**

Die Produktion von NirF aus *Dinoroseobacter shibae* erfolgte rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) mit pET22bnirF<sub>D,s</sub>.PCSSStrepII. Hierzu wurden Vorkulturen in LB-Medium ü.N. bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurden Hauptkulturen aus TB-Medium im Verhältnis 1:100 mit Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0.6 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und schließlich durch Zugabe von IPTG (25 µM) induziert. Die weitere Kultivierung zur Proteinproduktion erfolgte ü.N. bei 17 °C und 180 rpm.

## 2.7.2 Zellernte

Nach entsprechender Kultivierung wurden die Bakteriensuspensionen in 1 L-Portionen für 15-20 min bei 3'000 \* g und 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden von Überständen befreit und in Zellwaschpuffer resuspendiert und in ein sauberes Gefäß überführt. Sofern die Zellen einem periplasmatischen Aufschluss unterzogen werden mussten, wurde direkt mit den geernteten Zellen weitergearbeitet. Für einen Gesamtzellaufschluss konnten die Zellen bei -20 °C gelagert werden.

<b>Zellwaschpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	100 mM
	NaCl	150 mM
	Saccharose	20 % (w/v)

## 2.7.3 Periplasmatischer Aufschluss

Um einen möglichst effizienten und wenig verunreinigten periplasmatischen Extrakt zu erzeugen wurden geerntete Zellen (2.7.2) direkt weiterverarbeitet. Hierzu wurden die Zellen mit Periplasma-Aufschlusspuffer (verändert nach Bali *et al.*, 2010) im P/P-Verhältnis 3:1 versetzt und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 2-4 h auf einem Rollinkubator bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4'000 \* g für 20 min und 4 °C wurde zunächst ein zellfreier Extrakt erzeugt, der jedoch in Abhängigkeit von den weiteren Anwendungen einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 20'000 \* g (für Arbeiten mit Gravitationsfluss) oder 100'000 \* g (für die *Fast liquid protein chromatography* - FPLC) für 1 h bei 4 °C unterzogen wurde.

Alternativ wurden die Zellen mit Aufschlusspuffer-2 resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die periplasmatische Fraktion wurde dann durch Zentrifugation bei 16'000 \* g bei 4 °C für 30 min durch gewonnen und zur UV/Vis-Spektroskopie (2.8.6) eingesetzt.

<b>Periplasma-Aufschlusspuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	Saccharose	20 % (w/v)
	Polymyxin B-sulfat	2 mg/mL
	Complete protease inhibitor cocktail EDTA-free	1x à 10 mL
	(verändert nach Bali <i>et al.</i> , 2010)	
<b>Aufschlusspuffer-2</b>	Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
	Polymyxin B-sulfat	2 mg/mL

## 2.7.4 Aufschluss mittels French Press

Der Aufschluss mit der French Press-Zelle diente zur Erzeugung größerer Mengen an Rohextrakt für Proteinreinigungen. Hierzu wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer im P/P-Verhältnis 5:1 resuspendiert. Zwei bis drei Passagen durch die vorgekühlte (4 °C) French Press-Zelle mit ca. 19'200 p.s.i. sorgten für einen quantitativen Aufschluss. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20'000 \* g oder 100'000 \* g vom proteinhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand wurde zur Proteinreinigung eingesetzt.

<b>Aufschlusspuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	Complete protease inhibitor cocktail EDTA-free	1x à 10 mL

## 2.7.5 Aufschluss mittels Kugelmühle

Die Kugelmühle diente als Aufschlussmethode für die Immunopräzipitationsversuche, da hier parallel verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme bzw. Mutanten bearbeitet werden konnten ohne Kontaminationen zwischen den Mutanten herbeizuführen oder die Proben durch zu langsames Bearbeiten einem erhöhten Proteaseverdau auszusetzen. Zellen, die dem Kugelmühlenaufschluss mit der FastPrep<sup>®</sup>-24 (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) unterzogen wurden, wurden im P/P-Verhältnis 10:1 in Ko-IP-Puffer (2.6.2) aufgenommen und zu 750 µL Portionen auf Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Jedem Aliquot wurden etwa 250 µg Glaskörner (70-110 µm Durchmesser) hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte anschließend dreimal bei 4 °C für 45 s zu 5.5 m/s in der FastPrep mit 5 min Pause zwischen den Durchgängen. Die Ansätze wurden daraufhin bei 20'000 \* g und 4 °C 30 min lang zentrifugiert. Der erzeugte Überstand wurde von sedimentierten Glasperlen und Zelltrümmern abgenommen und zur Immunopräzipitation eingesetzt.

<b>Ko-IP-Puffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	0.5 % (v/v)
	Na-Deoxycholat	0.5 % (w/v)
	n-Octyl-β-D-glucopyranosid	0.5 % (w/v)
	EDTA	5 mM
	(verändert nach Lüer <i>et al.</i> , 2005)	

## 2.7.6 Aufschluss mittels Ultraschall

Der Ultraschallaufschluss war eine weitere Aufschlussmethode, die genutzt wurde, um verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme bzw. Mutanten in kurzer Zeit zu bearbeiten. Diese Methode wurde - als Alternative zum Aufschluss mit der French Press (2.7.4) - vor allem dazu genutzt Membrantrennungen (2.6.3) von mehreren Mutanten in kurzer Zeit durchzuführen. Hierzu wurden die Zellpellets in Membran-Aufschlusspuffer (2.6.3) resuspendiert (Verhältnis 5:1, P/P) und mit einer KE 76 Sonotrode am Typ-UW2070-Ultraschallgerät der Firma Bandelin Electronics (Berlin, Deutschland) für 7 min bei 65 % Amplitude und 0.4 s beschallt. Der erhaltene Rohextrakt wurde durch Zentrifugation bei 47'000 \* g für 20 min und 4 °C von Zelltrümmern und Proteinaggregaten befreit.

<b>Membran-Aufschlusspuffer</b>	Kaliumacetat	100 mM
	Magnesiumacetat	5 mM
	Hepes, pH 7.5	50 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	0.05 % (v/v)
	Complete protease inhibitor cocktail EDTA-free	1x à 10 mL
	(Magnowska, 2010)	

## 2.7.7 Proteinreinigung

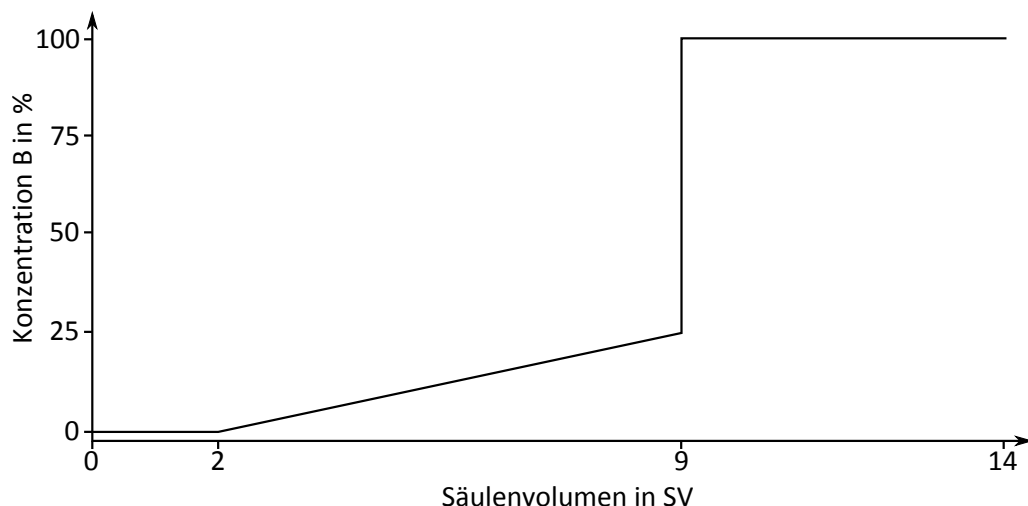
### 2.7.7.1 Dialyse von zellfreiem Extrakt und Proteinfractionen

Zellfreier Extrakt (Ultraschallaufschluss - 2.7.6) sowie vereinigte Proteinfractionen mussten entweder zur Vorbereitung der chromatographischen Trennung oder zur Lagerung der gereinigten Proteine entsalzt und umgepuffert werden. Hierzu wurde die jeweilige Probe in einen zunächst in ddH<sub>2</sub>O aufgekochten Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 14'000 Da) überführt und anschließend gegen mindestens 5 L Zielpuffer (Puffer-A, Puffer-C, Puffer-E oder Lagerpuffer) ü.N. bei 4 °C dialysiert.

<b>Puffer-A</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
<b>Puffer-C</b>	Phosphat-Puffer, pH 6.4 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )(Gomori, 2010)	25 mM
<b>Puffer-E</b>	Tris-HCl, pH 8.0 NaCl	25 mM 150 mM
<b>Lagerpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0 NaCl Glycerin	25 mM 150 mM 10 % (w/v)

### 2.7.7.2 Anionenaustauscherchromatographie

Die Anionenaustauscherchromatographie diente im Zuge eines mehrstufigen Reinigungsprotokolls zur ersten Anreicherung von Zielproteinen (verändert nach Parr *et al.*, 1976). Hierzu wurde eine 100 mL Q-Sepharose FastFlow-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) genutzt und mit dem Äkta Purifier System (GE Healthcare, München, Deutschland) bei einem Fluss von 1-2 mL/min betrieben. Die Reinigung erfolgte bei 17 °C und die eingesetzten Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (0.45  $\mu$ m Porengröße) und entgast. Zunächst wurden 200-300 mL eines zellfreien (2.7.4) dialysierten Extrakts (2.7.7.1) mit einer Äkta Sample Pump 960 (GE Healthcare, München, Deutschland) mit einer Flussrate von 1-2 mL/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 100 % Puffer A zu mindestens 2 Säulenvolumen (SV) oder bis die detektierte Absorption bei 280 nm annähernd konstant war (1-2 mL/min). Die Elution (1 mL/min) erfolgte daraufhin über 7 SV zu einer Konzentration von 25 % Puffer-B (siehe Abbildung 2.1). Hierbei eluierten die Zielproteine, was bei zusätzlicher Detektion der Absorptionen von 410 nm und 644 nm anhand der gegebenenfalls vorhandenen Häm *c*- und Häm *d*<sub>1</sub>-Kofaktoren zu beobachten war. Elutionsfraktionen wurden durch das FPLC-System in 8 mL Portionen gesammelt. Nachdem eine Konzentration von 25 % Puffer-B erreicht war, wurde das System durch eine stufenweise Erhöhung auf 100% Puffer-B eingestellt, sodass die Säule binnen 5 SV von noch gebundenen Proteinen befreit wurde. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (2.8.2) analysiert und Zielprotein enthaltende Fraktionen wurden zur Dialyse vereinigt. Letztere erfolgte im Anschluss gegen den Puffer-C (2.7.7.1).



**Abbildung 2.1: Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie**

0-2 SV: Waschen mit Puffer-A (2 SV oder bis Basislinie konstant)

2-9 SV: Elution mit steigender Konzentration von Puffer-B auf 25 % (7 SV)

9-14 SV: Waschen der Säule mit 100 % Puffer-B (5 SV)

Zur Lagerung wurde das System inklusive der Säule zunächst mit gefiltertem und entgastem

ddH<sub>2</sub>O (5 SV) und anschließend mit gefiltertem und entgastem 20%igen (v/v) Ethanol (5 SV) gespült. Vor einer erneuten Reinigung wurde das System inklusive der Säule in ddH<sub>2</sub>O (5 SV) gesetzt und anschließend wurde die Säule mit 2 SV 100 % Puffer-B konditioniert, bevor durch Spülen mit 5 SV 100 % Puffer-A die Startbedingung hergestellt wurde.

<b>Puffer-A</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
<b>Puffer-B</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	NaCl	1 M

### 2.7.7.3 Kationenaustauscherchromatographie

Die Kationenaustauscherchromatographie wurde im zweiten Schritt des Reinigungsprotokolls verwendet, um eine höhere Reinheit der Zielproteine zu erzielen (verändert nach Parr *et al.*, 1976). Hierzu wurde die dialysierte Proteinlösung (2.7.7.1) einer Stufengradientenelution (siehe Abbildung 2.2) unterzogen. Die Reinigung erfolgte bei 17 °C und alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und gefiltert (0.22 µm Porengröße). Das Säulenbettvolumen des SP-Sepharose FastFlow Materials (GE Healthcare) betrug 10 mL.



**Abbildung 2.2: Elutionsprofil der Kationenaustauscherchromatographie**

0-2 SV: Waschen mit Puffer-C (2 SV oder bis Basislinie konstant)

2-7 SV: Elution mit Stufe auf 25 % Puffer-D (5 SV)

9-12 SV: Waschen der Säule mit 100 % Puffer-D (5 SV)

Der Auftrag der Probe und die Stufengradientenelution verliefen dabei mit einem Fluss von 1 mL/min. Anschließend wurde die Säule mit mindestens 2 SV Puffer-C gespült oder aber so lange bis die detektierten Absorptionen (280 nm, 410 nm, 644 nm) konstant waren. Die



Elution des Zielproteins erfolgte nach dem Setzen einer Stufe auf 25 % Puffer-D für 5 Säulenvolumen. Die Elutionsfraktionen wurden zu 2 mL Portionen mit einem Sammler der FPLC aufgefangen, bevor die Säule zuletzt von noch gebundenen Proteinen befreit wurde (100 % Puffer-D für 5 SV).

Die erhaltenen Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE (2.8.2) analysiert und Zielprotein enthaltende Fraktionen wurden zur Dialyse vereinigt. Die Dialyse erfolgte in Abhängigkeit von der weiteren Verarbeitung gegen Puffer-E oder Lagerpuffer (2.7.7.1).

Die Säule und das FPLC-System wurden zu Lagerungszwecken zunächst mit 5 SV ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 5 SV auf 20%iges (v/v) Ethanol eingestellt. Vor erneuter Inbetriebnahme mussten das System und die Säule durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O (5 SV) von Ethanol befreit werden. Bevor eine chromatographische Trennung an der Säule erfolgen konnte, wurde die Säule zunächst mit 2 SV zu 100 % Puffer-D konditioniert, ehe sie mit 100 % Puffer-C (5 SV) umgepuffert wurde, um die Startbedingung herzustellen.

<b>Puffer-C</b>	Phosphat-Puffer, pH 6.4 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (Gomori, 2010)	25 mM
<b>Puffer-D</b>	Phosphat-Puffer, pH 6.4 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (Gomori, 2010) NaCl	25 mM  1 M

#### 2.7.7.4 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) (Lottspeich & Engels, 2012) wurde zum einen zu analytischen Zwecken genutzt um Kofaktorbindungen anhand von Ko-Elutionen zu überprüfen, sowie um Proteinoligomerisation nachzuweisen. Darüber hinaus wurde durch die analytische GPC versucht nachzuweisen, ob es zu einer Ko-Elution der verschiedenen Zielproteine kommt. Ein anderer methodischer Ansatz war die Nutzung der GPC als letzten Schritt der mehrstufigen Reinigungsprotokolle von NirS sowie NirN um hochreine Zielproteine zu erhalten.

Für die GPC kamen dabei Superdex 75 und Superdex 200 Säulenmaterialien der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) in unterschiedlichen Säulenvolumina zum Einsatz. Des Weiteren wurden nur Puffer und Lösungen verwendet, die vor Gebrauch entgast und gefiltert (0.22 µm Porengröße) wurden. Die Trennungen erfolgten bei 17 °C an einem Äkta Purifier System der Firma GE Healthcare (München, Deutschland).

Sowohl analytische als auch präparative GPC-Säulen wurden zur Inbetriebnahme mit 3 SV ddH<sub>2</sub>O gespült und dann mit dem jeweiligen Laufmittel bis zu konstanten Drücken äquilibriert (2 SV). Zur Lagerung wurden die Säulen anschließend zunächst mit 3 SV auf ddH<sub>2</sub>O und dann auf 3 SV 20%iges (v/v) Ethanol gesetzt.

### Analytische Gelpermeationschromatographie:

Zur analytischen GPC wurden Säulen mit Säulenvolumina von 3 bzw. 24 mL genutzt. Alle Laufgeschwindigkeiten wurden so angepasst, dass der resultierende Säulendruck den vom Hersteller angegebenen Maximaldruck nicht überstieg. Eine Kalibrierung der Säule erfolgte mit Standardproteinen der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), so dass eine Bestimmung des Oligomerenstatus bzw. Komplexierungsverhaltens bei Detektion von 280 nm, 410 nm sowie ggf. 644 nm möglich war. Als Laufmittel diente - sofern nicht anders beschrieben - der beschriebene Puffer-E.

### Präparative Gelpermeationschromatographie:

Bei der präparativen GPC wurde auf Säulenvolumina von 120 bis 320 mL zurückgegriffen. Die Chromatographie erfolgte ebenfalls an einem Äkta Purifier System (GE Healthcare, München, Deutschland) bei 17 °C. Die Trennungen wurden bei Flussgeschwindigkeiten durchgeführt, die zu Säulendrücken führten, die laut Angaben des Herstellers ohne Einschränkungen betrieben werden konnten. Die detektierten Proteine (280 nm, 410 nm und 644 nm) wurden mit einem Fraktionierer gesammelt und zur weiteren Nutzung ggf. konzentriert. Als Laufmittel dienten Puffer-E oder Lagerpuffer (2.7.7.1).

<b>Puffer-E</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	NaCl	150 mM
<b>Lagerpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	NaCl	150 mM
	Glycerin	10 % (w/v)

#### **2.7.7.5 Affinitätschromatographie mittels Strep-Tag**

Die Reinigung von StrepII- und OneStrep-getaggten Fusionsproteinen erfolgte in Anlehnung an die Angaben des Herstellers des verwendeten Säulenmaterials Strep-Tactin HC Fast-Flow der Firma IBA (Göttingen, Deutschland). Zunächst wurde das Säulenmaterial mit 5 SV Proteinpuffer äquilibriert. Bevor der zellfreie periplasmatische Extrakt (2.7.3) auf die Säule appliziert wurde, erfolgte eine 15-minütige Inkubation des Extrakts mit 250  $\mu$ L pro 50 mL einer 2 mg/mL Avidin enthaltenden Lösung, die in den Extrakt gegeben wurde. Nachdem der Extrakt vollständig auf die Säule gebracht wurde, musste zunächst mit 10 SV Waschpuffer-S gewaschen werden. Anschließend konnte eine Elution der Zielproteine mit 3-5 SV Elutionspuffer-S herbeigeführt werden. Elutionsfraktionen wurden gesammelt und Proben mittels SDS-PAGE (2.8.2) analysiert. Die Regeneration des Säulenmaterials und die Lagerung richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

Proteolytischer Verdau zum Entfernen des StrepII-Tags von NirF<sub>D,s</sub>-StrepII erfolgte nach Elution mittels Prescission-Protease (10 U/mg) für 2 h bei RT.

<b>Waschpuffer-S</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	NaCl	150 mM
<b>Elutionspuffer-S</b>	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	NaCl	150 mM
	Desthiobiotin	5-10 mM

### 2.7.8 Häm $d_1$ -Extraktion

Die Kofaktorextraktion zur Gewinnung von Häm  $d_1$  aus der Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase wurde ähnlich zu der von Weeg-Aerssens *et al.* (1991) beschriebenen Methode durchgeführt (Schnitzer, 2011). Hierzu wurde gereinigtes Protein gegen Puffer-G dialysiert (2.7.7.1) und auf eine Konzentration von 1 mg/mL Nitritreduktase eingestellt. Ein Milliliter der 1 mg/mL konzentrierten Lösung konnte dann mit 5 mL eiskaltem, saurem Aceton gemischt und für 1 min geschüttelt werden. Ausgefallenes Häm  $c$ -haltiges Protein wurde daraufhin durch Zentrifugation (5 min,  $16'100 \times g$ ) sedimentiert. Der Häm  $d_1$ -haltige Überstand wurde in einen Glaskolben überführt, während das Proteinpellet abermals mit 3 mL Aceton gewaschen wurde. Nach erneutem Zentrifugieren und Abtrennen wurden die Überstände im Glaskolben vereinigt. Zur Rückgewinnung der semi-apo-Nitritreduktase wurde das Proteinpellet zunächst mit 3 mL Puffer-H gewaschen, erneut sedimentiert und das vom Überstand befreite Proteinpellet in Puffer-I resuspendiert. Die so erhaltene Cytochrom  $c$  NirS konnte bei 4 °C gelagert werden. Das Häm  $d_1$  enthaltende Aceton wurde im Stickstoffstrom abgedampft und der wässrige Rückstand mit Natronlauge (1 M) auf pH 7.3 eingestellt.

<b>saures Aceton</b>	Aceton	100 % (v/v)
	HCl	24 mM
<b>Puffer-G</b>	Hepes, pH 7.3	25 mM
<b>Puffer-H</b>	Phosphatpuffer, pH 7.0	25 mM
	( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )(Gomori, 2010)	
<b>Puffer-I</b>	Phosphatpuffer, pH 7.0	25 mM
	( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )(Gomori, 2010)	
	Urea	6 M

### 2.7.9 *In vivo* Protein-cross-linking

Die Methode des *in vivo* Protein-cross-linking (IVPCL) orientierte sich an den Vorgaben von Vasilescu *et al.* (2004). Zunächst wurden dazu sechs 120-mL *P. aeruginosa*-Kulturen anaerob

für 8 h bei 37 °C (120-140 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die in Tabelle 2.10 aufgeführten Mengen an Formaldehyd, für die entsprechende Inkubationszeit bei 120-140 rpm, in die anaeroben Flaschen gespritzt. Die Vernetzungsreaktion wurde schließlich durch Zugabe von Glycinlösung (125 mM Endkonzentration) für 5 min bei 37 °C abgestoppt. Nach dem Abstoppen konnten die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4'000 \* g, 4 °C) sedimentiert werden, bevor sie anschließend mit Zellwaschpuffer (2.7.2) von überschüssigem Glycin befreit wurden. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4'000 \* g, 4 °C) konnte das erhaltene Zellpellet für weitere Experimente verwendet werden.

**Tabelle 2.13: *In vivo* Protein-cross-linking Schema**

Formaldehydkonzentration	Inkubationszeit
0.125 % (v/v)	20 min
0.5 % (v/v)	20 min
1 % (v/v)	10 min
1 % (v/v)	20 min
1 % (v/v)	30 min
1 % (v/v)	60 min

Um die optimalen IVPCL-Bedingungen zu finden, wurden nach Vernetzen Immunopräzipitationen und Western-Blot-Analysen des präzipitierten Zielproteins durchgeführt. Für alle weiteren Experimente, in denen das *in vivo* Protein-cross-linking eingesetzt wurde, erfolgte die Vernetzung mit 0.125 % (v/v) Formaldehydlösung für 20 min bei 37 °C bei 120-140 rpm.

<b>Formaldehydlösung</b>	Formaldehyd	37 % (w/v)
<b>Glycinlösung</b>	Glycin	2.5 M
<b>Zellwaschpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	Saccharose	20 % (w/v)

## 2.8 Proteincharakterisierungen

### 2.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde nach Bradford (1976) unter Verwendung des Bradford Reagenz der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bestimmt. Die

Methode wurde entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA), das zu verschiedenen Konzentrationen (0.1-1 mg/mL) in dem entsprechenden Probenpuffer gelöst war.

## 2.8.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt eine Methode dar, um Proteingemische ihrer relativen Molekularmasse ( $M_r$ ) nach zu trennen (Laemmli, 1970). Anschließend können die Proteinmoleküle durch verschiedene Färbereagenzien sichtbar gemacht werden. Proben für die SDS-PAGE wurden mit 2x SDS-Probenpuffer oder 6x SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C erhitzt und für 2 min bei 16'100 \* g zentrifugiert. Zur Trennung im Gel wurden 12%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele nach Righetti (1990) entsprechend der angegebenen Zusammensetzung verwendet. Im Fall der Immunoaffinitätschromatographie wurden All-kDA Gele der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Die Trennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgte bei 200 V für 35-55 min unter Verwendung von SDS-Laufpuffer. Zur Abschätzung der Proteingröße wurden verschiedene Proteinstandards verwendet. Die Färbung der Gele erfolgte entweder für 1 h mit Coomassie-Lösung, für 20 min mit Instant Blue der Firma Expedeon (San Diego, USA) oder SYPRO Ruby der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. Coomassie gefärbte Gele wurden durch Einsatz von Entfärberlösung auf Sicht entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele digitalisiert und getrocknet.

<b>Rotiphorese Gel 30</b>	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0.8 % (w/v)
<b>Trenngel 12 % für 4 Gele</b>	Rotiphorese Gel 30	8 mL
	0.4 % SDS (w/v) in	
	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5 mL
	ddH <sub>2</sub> O	7 mL
	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	200 µL
	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	20 µL
<b>Sammelgel 6 % für 4 Gele</b>	Rotiphorese Gel 30	2 mL
	0.4 % SDS (w/v) in	
	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL
	ddH <sub>2</sub> O	5.5 mL
	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	100 µL
	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	10 µL

<b>2x SDS-Probenpuffer</b>	Tris-HCl, pH 6.8	100 mM
	Glycerin	40 % (w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	2 % (v/v)
	SDS	3.2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.2 % (w/v)
<b>6x SDS-Probenpuffer</b>	Tris-HCl, pH 6.8	300 mM
	Glycerin	50 % (w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	6 % (v/v)
	SDS	9 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.6 % (w/v)
<b>SDS-Laufpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.8	50 mM
	Glycin	385 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G250	0.25 % (w/v)
	in ddH <sub>2</sub> O	
<b>Entfärberlösung</b>	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)
	in ddH <sub>2</sub> O	

### 2.8.3 Proteindetektion mittels Western-Blot

Elektrophoretisch getrennte Proteinproben wurden zur immunochemischen Detektion entweder auf Nitrocellulosemembranen (GE Healthcare, München, Deutschland) oder Polyvinylidenfluorid-Membranen (Merck Millipore, Billerica, USA) (PVDF) übertragen (verändert nach Towbin *et al.*, 1979 und Gershoni & Palade, 1983).

Zum Blotten wurde entweder ein Bio-Rad (München, Deutschland) semi-dry Blotsystem oder ein Transblot Turbo, ebenfalls von Bio-Rad (München, Deutschland), genutzt.

Nitrocellulosemembranen wurden zunächst gewässert, bevor sie für 10 min im entsprechenden Transferpuffer inkubiert wurden.

PVDF-Membranen wurden zu Beginn für 10 min in Methanol aktiviert, ehe sie für 10 min im entsprechenden Transferpuffer inkubiert werden konnten.

Das SDS-PA-Gel (2.8.2), welches die zu übertragenden Proteine enthielt, musste vor dem Blotten für 10 min im entsprechenden Transferpuffer äquilibriert werden, während zwei Stücke Whatmanpapier in Transferpuffer getränkt wurden.

Eines dieser Whatmanpapiere wurde auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Die Membran wurde anschließend auf dem Papier platziert und darauf wiederum das äquilibrierte SDS-PA-Gel gelegt. Den Abschluss dieses Blotpakets bildete das zweite getränkte Whatmanpapier. Die Kammer wurde entsprechend verschlossen und konnte im Fall des Semi-Dry Blotters für 45 min bei 10 V betrieben werden, während der Trans-Blot Turbo die Proteine in 12 min bei 1 V und 25 mA übertrug.

Nach erfolgreichem Verlauf des Blotvorgangs wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und im Falle von anschließender Verwendung zur N-terminalen Sequenzierung gewässert. Sofern die Membran für die immunochemische Detektion vorgesehen war, musste sie im nächsten Schritt blockiert werden, um freie Bindungsstellen auf der Membranoberfläche zu sättigen. Zu diesem Zweck wurden Nitrocellulosemembranen gewässert während PVDF-Membranen stattdessen für 2 min in Methanol gelegt wurden. Anschließend erfolgte für beide Membrantypen eine einstündige Inkubation in Blockierlösung-1 (Detektion mittels mAK) oder -2 (Detektion mittels Strep-Tactin-Konjugat, IBA, Göttingen, Deutschland) bei Raumtemperatur und Bewegung der Lösung auf einem Kippschüttler (Mini Rocker Shaker, Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland).

Nach dem Blockieren wurden die Membranen kurz mit Wasser gespült, bevor sie zunächst in einem ersten Inkubationsschritt mit primärem monoklonalem Antikörper oder Strep-Tactin-Konjugat in 25 mL TBS für 1 h in Kontakt gebracht wurden. Dies geschah wie in allen weiteren Schritten bei RT und Bewegung auf dem Kippschüttler. Im Anschluss folgten drei zehnminütige Waschschrte mit 25 mL TBS-T. Sofern die Detektion über Antikörper erfolgte wurde ein weiterer Inkubationsschritt mit sekundärem Antikörper in 25 mL TBS für 1 h durchgeführt. Die drei zehnminütigen Waschschrte mit TBS-T wurden wiederholt, bevor die mit Antikörpern oder Strep-Tactin-Konjugat beschichteten Membranen für 20 min in 25 mL APB inkubiert wurden. Zur Entwicklung mittels Alkalischer Phosphatase, die an sekundären Antikörper oder das Strep-Tactin-Konjugat gebunden war, wurden 20 mL APB mit den Färbereagenzien NBT (132  $\mu$ L) und BCIP (33  $\mu$ L) versetzt. Die Membran wurde dann in die Entwicklerlösung gelegt und auf Sicht gefärbt. Das Abstoppen des Färbens erfolgte durch Wässern der Membran und anschließendem Einlegen der Membran in TBS-T (20 min). Die Membranen wurden zuletzt nochmals mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation digitalisiert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in getrocknetem Zustand.

<b>Transferpuffer (für PVDF)</b>	Tris-HCl, pH 9.5	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	15 % (v/v)
<b>Transferpuffer (für Nitrocellulose)</b>	Tris-HCl, pH 8.8	21.3 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 % (v/v)

<b>TBS</b>	Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
	NaCl	150 mM
<b>TBS-T</b>	Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0.1 % (v/v)
<b>Blockierlösung-1</b>	TBS	
	Milchpulver	5 % (w/v)
<b>Blockierlösung-2</b>	TBS	
	Rinderserumalbumin Fraktion V	3 % (w/v)
<b>APB</b>	Tris-HCl, pH 9.5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
<b>NBT</b>	NBT in 70 % (v/v) DMF	50 mg/mL
<b>BCIP</b>	BCIP in 100 % (v/v) DMF	50 mg/mL
<b>prim. Antikörper</b>	$\alpha$ NirS in TBS	0.3-10 $\mu$ g/mL
	$\alpha$ NirN in TBS	5-33 $\mu$ g/mL
<b>sek. Antikörper- AP-Konjugat</b>	$\alpha$ Maus-IgG in TBS	1:4000
	$\alpha$ Maus-IgM in TBS	1:4000
<b>Strep-Tactin-AP-Konjugat</b>	Konjugat in TBS	1:4000

## 2.8.4 N-terminale Sequenzierung

Wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben wurden die Zielproteine auf eine PVDF-Membran geblotet. Die so beschichteten Membranen konnten durch Färbung mit Ponceau S-Lösung (5 min bei RT, dann mit Wasser spülen) oder durch Inkubation in 15%iger (v/v) Ethanollösung (5 min bei RT, dann trocknen) auf das Vorhandensein der Zielproteine überprüft werden. Dabei färbten sich die Proteine durch Einlagerung von Ponceau S rot bzw. wurde die Membran an proteinbeschichteten Oberflächen durch Ethanol beim Trocknen transparent, während freie Membranstellen weiß blieben. Die so detektierten Proteine wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die N-terminale Sequenzierung von den so erzeugten Proben wurde von R. Getzlaff und B. Jaschok-Kentner am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braun-



schweig) durchgeführt. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen wurden mit Sequenzen der Datenbank [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Winsor *et al.*, 2011) des *P. aeruginosa* PAO1 UW1-Stamms verglichen.

<b>5x Ponceau S-Lösung</b>	Ponceau S	2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	1.84 M
	Sulfosalicylsäure	1.2 M

## 2.8.5 Massenspektrometrie

Die Erhebung massenspektrometrischer Daten erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) durch Dr. M. Kucklick oder U. Felgenträger. Dazu wurden SDS-PA-Gelstücke, die zu untersuchende Proteine enthielten, nach dem Färben (2.8.2) ausgeschnitten. Die Durchführung eines tryptischen Verdaus, einer Peptidextraktion sowie Nano-HPLC-MS/MS-Analysen erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) (verändert nach Toyofuku *et al.*, 2012a). Die Trennung der Proteinproben erfolgte am Ultimate 3000 RSLCnano-HPLC System (Dionex, Sunnyvale, USA) (Düvel *et al.*, 2012). Die MS/MS-Daten wurden durch ein Orbitrap velos Massenspektrometer (Thermo, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Die Prozessierung der Daten erfolgte automatisch durch die Mascot Deamon Software (Matrix Science, Boston, USA). Die Analyse der Daten erfolgte durch Vergleich mit der NCBI-Datenbank oder der Pseudomonas-Datenbank (Winsor *et al.*, 2011).

## 2.8.6 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde genutzt um Absorptionsspektren von Proteinen sowie Extrakten aufzuzeichnen. Aufgrund der Absorptionen der Häm *c*- und Häm *d*<sub>1</sub>-Kofaktoren konnte durch die Spektroskopie bestimmt werden, ob entsprechende Kofaktoren im Protein gebunden waren. Für die Messung wurde ein V-650 UV/Vis-Spektrometer der Firma Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) genutzt. Die proteinhaltige Probe wurde in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) vermessen. Eine Reduktion der Kofaktoren der Proteinlösung wurde durch Zugabe von einer Spatelspitze Natriumdithionit erzeugt.

## 2.9 Proteinkristallisation

Zur Kristallisation des *c*-Typ Cytochroms NirN wurde das Protein in einer StrepII-getaggen Variante angesetzt, in der das Protein nach der Strep-Tactin Reinigung auf 15 mg/mL konzentriert wurde. Die Kristallisationsexperimente erfolgten in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz und Sayantan Saha vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. In ersten Screening-Versuchen wurde die *sitting drop vapor diffusion*-Methode (McRee, 1999 und Rhodes, 2006) verwendet. Durch den Pipettierroboter Honeybee 961 (Zinsser Analytic, Deutschland) wurden die Screens mit 200 nL Proteinlösung zu jeweils 5 mg/mL und

7.5 mg/mL Endkonzentration durch Mischen mit 200 nL Puffer angesetzt. Das Wachstum der Kristalle wurde über sechs Wochen regelmäßig kontrolliert. Die verwendeten Screens wurden von der Firma QiaGen (Hilden, Deutschland) bezogen.

<b>Eingesetzte Screens</b>	JCSG Core I
	JCSG Core II
	JCSG Core III
	JCSG Core IV
	pH Clear
	JCSG <sup>+</sup> -Suite

Bedingungen, die kristalline Cluster erzeugten, wurden durch Anwendung des *hanging drop vapor diffusion*-Verfahrens (McRee, 1999 und Rhodes, 2006) unter Variation der entsprechenden Pufferbedingungen optimiert.

## 2.10 Immunobiologische Methoden

### 2.10.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Um Immunopräzipitationen und Immunoaffinitätschromatographie durchführen zu können, wurden polyklonale Antikörper (pAK) erzeugt (Metabion, München, Deutschland). Hierbei wurden Kaninchen mit gereinigtem (2.7.7) und sterilfiltriertem Antigen (NirS oder NirN) immunisiert. Nach erfolgreicher Immunisierung wurden die im Serum enthaltenen Antikörper an antigenbeschichteten Chromatographiesäulen gereinigt. Die Säulenmatrix wurde ebenfalls durch die Firma Metabion (München, Deutschland) erzeugt.

### 2.10.2 Erzeugung monoklonaler Antikörper

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen waren auf hochspezifische Antikörper z. B. für die Western-Blot-Analyse (2.8.3) angewiesen. Zu diesem Zweck wurden in Kooperation mit S. Buchmeier (Antibody Facility der TU Braunschweig, Braunschweig, Deutschland) monoklonale Antikörper (mAK) gegen NirS und NirN erzeugt. Hierfür wurde zunächst 1 mg Antigen (NirS oder NirN) in mehreren Schritten gereinigt (2.7.7) und sterilfiltriert. Im Anschluss wurde das Antigen nach einem Standardprotokoll zur Immunisierung von Mäusen der BALP/c-Linie vorbereitet und diesen injiziert. Die Immunisierung, Erzeugung von Hybridomazellen und Klonierung wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Nachdem einzelne Antikörper produzierende Hybridomazellen erhalten wurden, wurden die ins Zellmedium sekretierten Antikörper durch *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) und Western-Blot-Analysen getestet und auf ihre Subklasse untersucht.

Reinigungen von monoklonalen Antikörpern erfolgten mittels Protein A-, Protein G- oder Pro-

tein L-Agarose entsprechend der Angaben des Herstellers des Säulenmaterials (GenScript, Piscataway, USA).

## 2.11 Interaktionsstudien

### 2.11.1 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde eingesetzt, um native Proteine aus zellfreiem *P. aeruginosa* Extrakt zu präzipitieren. Des Weiteren wurde durch diese Methode untersucht, ob es zu Ko-Präzipitationen von Interaktionspartnern der Zielproteine kam. Hierzu wurden *P. aeruginosa*-Kulturen eingesetzt, die für 8 h unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurden, um in der späten exponentiellen Phase geerntet werden zu können. Die Kulturen wurden direkt weiterverarbeitet oder vor der Ernte einem *in vivo* Protein-cross-linking (2.7.9) unterzogen. Zu Beginn wurden 0.5 g Zellpellet (Nasszellgewicht) in 5 mL Ko-IP-Puffer (verändert nach Lüer *et al.*, 2005) resuspendiert. Die Zellen wurden wie in 2.7.5 beschrieben aufgeschlossen. 750  $\mu$ L des zellfreien Extrakts wurden anschließend mit 2  $\mu$ g der polyklonalen NirS- oder NirN-Antikörper für 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte eine 90-minütige Inkubation der Lösung mit 80  $\mu$ L Protein-A-Agarose (1:1 in Ko-IP-Puffer) bei 4 °C und leichtem Schütteln. Die Matrix wurde nach Zentrifugation bei RT (1 min, 16'100 \* g) vom Überstand befreit und dreimal mit je 650  $\mu$ L Matrixwaschpuffer und wiederholtem Zentrifugieren (1 min, 16'100 \* g, RT) gewaschen und abschließend mit 2x SDS-Probenpuffer (2.8.2) versetzt, aufgeköcht und auf ein SDS-PA-Gel appliziert. Weiterhin wurden die Proben geblottet und Zielproteine detektiert (2.8.3).

<b>Ko-IP-Puffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	0.5 % (v/v)
	Na-Deoxycholat	0.5 % (w/v)
	n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	0.5 % (w/v)
	EDTA	5 mM
	(verändert nach Lüer <i>et al.</i> , 2005)	
<b>Matrixwaschpuffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	0.1 % (v/v)
	Na-Deoxycholat	0.1 % (w/v)
	n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	0.1 % (w/v)
	EDTA	1 mM

## 2.11.2 Strep-Protein Interaktions-Experiment

Proben für die Strep-Protein Interaktions-Experimente (SPINE) wurden wie bereits für die Immunopräzipitation (2.11.1) beschrieben vorbereitet. 500  $\mu$ L des vernetzten, zellfreien *P. aeruginosa* Extrakts wurden mit 200  $\mu$ L Strep-Tactin-HC Säulenmaterial (1:1 in Ko-IP-Puffer - 2.11.1) der Firma IBA (München, Deutschland) versetzt und für 90 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend analog zu 2.11.1 dreimal mit Matrixwaschpuffer (2.11.1) gewaschen und zur SDS-PAGE (2.8.2) vorbereitet. Die Proben wurden schließlich geblottet und Zielproteine detektiert (2.8.3).

## 2.11.3 Immunoaffinitätsreinigung

Die Immunoaffinitätsreinigung sollte genutzt werden, um Zielproteine im Komplex mit Interaktionspartnern zu reinigen. Die Interaktionspartner sollten anschließend mittels Massenspektrometrie (2.8.5) identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst eine Säulenmatrix mit Antikörpern quervernetzt (verändert nach Schneider *et al.*, 1982) und anschließend zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

### 2.11.3.1 Präparation des Immunoaffinitätssäulenmaterials

Als Trägermaterial wurde ein 1:1 Gemisch aus Protein-A- und Protein-G-Agarose der Firma GenScript (Piscataway, USA) mit einem Säulenvolumen von 1 mL verwendet. Diese Matrix wurde zunächst dazu genutzt um 1 mg der polyklonalen  $\alpha$ NirN AKs bzw. 1 mg eines monoklonalen  $\alpha$ NirS AK-Mix, bestehend aus ungefähr gleichen Teilen der verschiedenen hergestellten mAKs (2.10.2), zu binden. Dazu wurde nach den Angaben des Herstellers des Säulenmaterials vorgegangen. Anschließend wurde die Säule mit 50 SV des Bindepuffers mit einem Fluss von ca. 1.3 mL/min (Minipuls Evolution, Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland) gewaschen. Nach diesem Schritt konnte die Matrix in Lagerpuffer bei 4 °C für kurze Zeit gelagert werden oder direkt zum Vernetzen (verändert nach Schneider *et al.*, 1982) weiterverarbeitet werden. Hierzu wurde die Säule zunächst mit 30 SV 0.2 M Triethanolamin (pH 8.2) gewaschen. Im Anschluss wurde die Säulenmatrix in 20 SV 0.2 M Triethanolamin (pH 8.2) mit 70 mM Dimethylpimelimidat aufgenommen und für 45 min bei RT inkubiert. Die Matrix wurde anschließend durch leichtes Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Vernetzen wurde durch Resuspendieren in 25 SV 70 mM Ethanolamin (pH 8.2) und fünfminütiger Inkubation bei RT gestoppt. Die so präparierte Matrix wurde mit 50 SV Bindepuffer gewaschen. Die Lagerung der Matrix für kurze Zeit (nicht länger als zwei Tage) erfolgte bei 4 °C in Lagerpuffer.

<b>Bindepuffer</b>	Phosphatpuffer, pH 8.0	20 mM
	( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )(Gomori, 2010)	
	NaCl	150 mM

**Lagerpuffer****Bindepuffer**NaN<sub>3</sub>

0.02 % (w/v)

**2.11.3.2 Immunoaffinitätschromatographie**

Zur immunoaffinitätschromatographischen Reinigung von Antigen aus vernetztem Protein-extrakt wurden jeweils ca. 2 g (Nasszellgewicht) *P. aeruginosa*-Zellen in 10 mL Ko-IP-Puffer resuspendiert und wie für die Immunopräzipitation (2.11.1) beschrieben mit der Kugelmühle (2.7.5) zu einem zellfreien Extrakt verarbeitet. Der Extrakt wurde im Anschluss mit 5 mL Bindepuffer (2.11.3.1) versetzt und durch Inkubation (15 min bei 4 °C und leichtem Schütteln) mit 300 µL hinzugegebenem Protein-A-/Protein-G-Agarose Gemisch (1:1 in Bindepuffer vgl. 2.11.3.1) aufgearbeitet. Dies diente dazu, mögliche Interaktionspartner des Extraktes, die an Protein-A bzw. Protein-G binden, zu entfernen. Der aufgearbeitete Extrakt wurde dann vom Protein-A-/Protein-G-Agarose Gemisch durch Zentrifugation (2 min, 16'100 \* g, 4 °C) getrennt und abgenommen. Schließlich wurde der Extrakt mit 300 µL (1:1 in Bindepuffer) des in 2.11.3 vorbereiteten Säulenmaterials für 2 h bei 4 °C und gelegentlichem Invertieren inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in einer Leersäule aufgefangen und nachfolgenden - in Tabelle 2.14 dargestellten - Waschschritten unterzogen werden.

**Tabelle 2.14: Waschschriffe der Immunoaffinitätschromatographie**

<b>Säulenvolumen</b>	<b>Puffer</b>
60 SV	TBS
30 SV	TBS-T
30 SV	TBS-S
30 SV	Ko-IP-Puffer

Da die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper häufig sehr stabil ist, erfolgte die Elution der Antigene von der Säulenmatrix in mehreren Schritten, welche in Tabelle 2.15 dargestellt sind. Dazu wurde das Säulenmaterial in einer Mini Bio-Spin Leersäule der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) aufgefangen und bei 1'000 \* g für wenige Sekunden eluiert. Das Eluat wurde jeweils in einem 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen und direkt nach Zentrifugation zur Neutralisation auf 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) Endkonzentration durch Zugabe von 1 M Tris-HCl (pH 8.0) eingestellt.

Tabelle 2.15: Elutionsschritte der Immunoaffinitätschromatographie

Säulenvolumen	Puffer	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
4 SV	Elutionspuffer-1	15 min	37 °C
4 SV	TBS	5 min	RT
4 SV	Elutionspuffer-2	15 min	37 °C

Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und in Merck Millipore (Billerica, USA) Spin Konzentrationszellen mit Ausschlussgrößen < 3 kDa auf ein Endvolumen von 50  $\mu$ L konzentriert. Die so erhaltenen Proben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und aufgeköcht (2.8.2), um anschließend in Mini-PROTEAN any kD TGX Precast Gelen der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) elektrophoretisch getrennt und mit SYPRO Ruby der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) gefärbt zu werden. Die erhaltenen Banden wurden detektiert und für massenspektrometrische Analysen (2.8.5) ausgeschnitten.

<b>TBS</b>	Tris-HCl, pH 7.5 NaCl	50 mM 150 mM
<b>TBS-T</b>	TBS Tween 20	0.1 % (v/v)
<b>TBS-S</b>	TBS NaCl (insgesamt)	500 mM
<b>Ko-IP-Puffer</b>	Tris-HCl, pH 8.0 NaCl NP-40 Na-Deoxycholat n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid EDTA (verändert nach Lüer <i>et al.</i> , 2005)	50 mM 150 mM 0.5 % (v/v) 0.5 % (w/v) 0.5 % (w/v) 5 mM
<b>Elutionspuffer-1</b>	Glycin, pH 2.5	100 mM
<b>Elutionspuffer-2</b>	Diethylamin, pH 11.5 Natriumdeoxycholat (Schneider <i>et al.</i> , 1982)	50 mM 0.5 % (w/v)

## 2.12 Bioinformatische Methoden

Zur bioinformatischen Analyse kamen verschiedene Programme zum Einsatz. Eine Übersicht der verwendeten Software findet sich in Tabelle 2.16.

**Tabelle 2.16: Verwendete bioinformatische Programme**

Programm	Zweck	Quelle
Clustal Omega	Proteinsequenz Alignments	Sievers <i>et al.</i> (2011)
LipoP	Lipoprotein Analyse	Juncker <i>et al.</i> (2003)
NCBI Database	Datenbank	U.S. National Library of Medicine
Phyre 2	Proteinmodellierung	Kelley & Sternberg (2009)
Pseudomonas Datenbank	Datenbank	Winsor <i>et al.</i> (2011)
Pymol	Proteinstrukturen	Schrödinger, LLC
SignalP	Signalsequenz Analyse	Petersen <i>et al.</i> (2011)

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Die periplasmatische Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* (NirS<sub>P.a.</sub>) ist ein gut charakterisiertes Enzym der Denitrifikationskaskade, in der es eine wichtige Rolle im Anpassungsprozess des denitrifizierenden Bakteriums an sauerstofffreie Lebensbedingungen spielt. Allerdings beziehen sich die verstandenen Charakteristika der NirS hauptsächlich auf deren biochemische Eigenschaften. Wenig ist hingegen bezüglich der Biosynthese des essenziellen Häm  $d_1$ -Kofaktors bekannt sowie über die Prozesse, die zum Einbau von Häm  $d_1$  in NirS führen. Diese Arbeit soll dazu beitragen die im Periplasma ablaufenden Prozesse, die an der Maturation der NirS beteiligt sind, besser zu verstehen und experimentelle Grundlagen für weitere Analysen zu schaffen.

### 3.1 Bioinformatische Analyse der Proteine NirF und NirN

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei NirS um ein gut charakterisiertes Enzym (1.4.1). Darüber hinaus werden von *P. aeruginosa* die beiden bisher kaum charakterisierten Nir-Proteine NirN und NirF ins Periplasma sekretiert. Hier erfolgt nun eine kurze grundlegende bioinformatische Analyse dieser Proteine. Dazu wurde die Transportsignalsequenz von NirF *in silico* analysiert sowie eine Modellierung der NirF- und NirN-Strukturen durchgeführt. Weiterhin sollte ein allgemeiner Aminosäuresequenzvergleich der drei Häm  $d_1$ -bindenden Proteine NirS, NirN und NirF (Nurizzo *et al.*, 1997, Zajicek *et al.*, 2009 und Bali *et al.*, 2010) Identitäten zwischen diesen Proteinen aufzeigen.

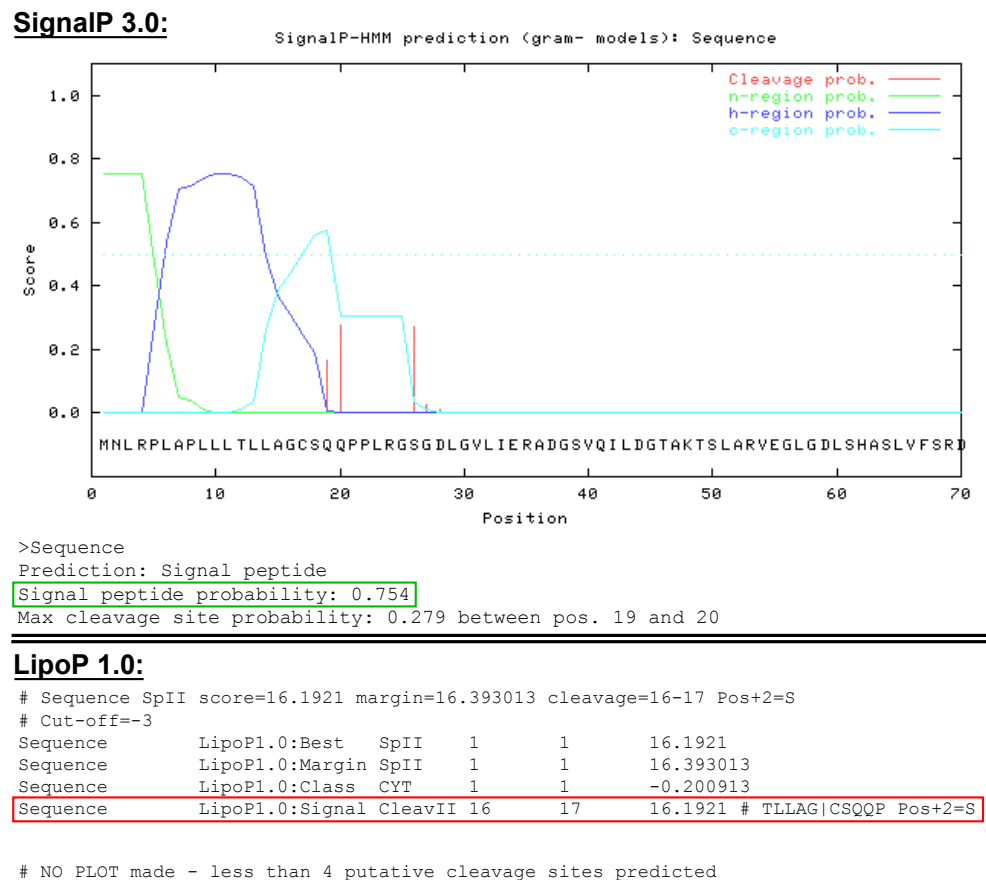
#### 3.1.1 Analyse der Signalsequenz von NirF

Wie im Jahr 2010 von Bali *et al.* gezeigt wurde, handelt es sich bei NirF aus *Paracoccus pantotrophus*, um ein periplasmatisch lösliches Protein. Darüber hinaus wurde in dieser Stu-



die über weitere NirF-Homologe aus anderen Organismen berichtet, die ebenfalls über *in silico* gefundene Transportsequenzen verfügen. Eine Ausnahme bildeten die NirF aus *Magnetospirillum magneticum* sowie NirF aus *P. aeruginosa* (Bali *et al.*, 2010). Die *Pseudomonas*-Datenbank (Winsor *et al.*, 2009) wies NirF aus *P. aeruginosa* im Jahr 2009 als vermeintlich cytoplasmatisches Protein aus.

Die in dieser Arbeit erfolgte Neubewertung der Signalsequenz von NirF<sub>P.a.</sub> wurde mit den Programmen SignalP (Petersen *et al.*, 2011) und LipoP (Juncker *et al.*, 2003) durchgeführt (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Bioinformatische Ergebnisse der Signalsequenzauswertung von NirF aus *P. aeruginosa*.** Oben: Ergebnisse der Analyse mit SignalP 3.0 (Petersen *et al.*, 2011). Dabei wird deutlich, dass eine vermeintliche Transportsequenz vorliegt (75.4 % Wahrscheinlichkeit, grüne Markierung). Unten: Auswertung mittels LipoP 1.0 (Juncker *et al.*, 2003). Hierbei wird eine Signalpeptidase II-Schnittstelle (SPII - Score: ca. 16.2, rote Markierung) erkannt.

Abbildung 3.1 stellt die Auswertungen von SignalP und LipoP dar. Es zeigte sich zunächst, dass die N-terminale Aminosäuresequenz der NirF<sub>P.a.</sub> kein *twin arginine transport*-Motiv (Natale *et al.*, 2008) aufweist. Darüber hinaus ist keine Signalpeptidase I-Schnittstelle (AxA-Motiv; Natale *et al.*, 2008) vorhanden. SignalP wies dennoch auf eine ca. 75%ige Wahr-

scheinlichkeit für eine Signalsequenz zum periplasmatischen Export hin. LipoP ermöglichte hier die Unterscheidung, ob eine Transmembranhelix vorliegen könnte oder ob eine Signalpeptidase II-Erkennungssequenz, die sogenannte Lipobox (Hayashi & Wu, 1990), vorhanden ist. Tatsächlich wurde von dem Programm lediglich eine SPase II-Schnittstelle vorhergesagt (Abb. 3.1). Dies deutete darauf hin, dass es sich bei NirF aus *P. aeruginosa* um ein Lipoprotein handelt. In einer, zeitgleich zu diesen durchgeführten Studien, erschienenen Veröffentlichung von Remans *et al.* wurde im Jahr 2010 ebenfalls aufgrund von bioinformatischen Analysen vorhergesagt, dass es sich bei NirF<sub>P.a.</sub> um ein putatives Lipoprotein handelt.

Die sich anschließende Frage, ob NirF<sub>P.a.</sub> als Lipoprotein in der inneren oder äußeren bakteriellen Membran verankert sein könnte, wurde durch LipoP falsch beantwortet. Das Programm wies Serin als +2 Aminosäure (AS) des Lipoproteins aus und richtete sich dabei nach der sogenannten +2-Rule für den gramnegativen Organismus *E. coli* (Yamaguchi *et al.*, 1988, Juncker *et al.*, 2003 und Tokuda & Matsuyama, 2004). In *P. aeruginosa* ist die Sortierung von Lipoproteinen allerdings zusätzlich von den Aminosäuren an den Positionen +3 und +4 abhängig (Narita & Tokuda, 2007 und Lewenza *et al.*, 2008). Somit steht die Aminosäuresequenz mit dem Motiv CSQQP für eine vermeintliche Lokalisation des Proteins auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran. Zu diesem Schluss kam auch die Studie von Remans *et al.* (2010). Die Ergebnisse dieser Neubewertung erschienen somit sinnvoll, da sich die löslichen Domänen der NirF aus *P. aeruginosa*, ebenso wie die von anderen NirF-Homologen, z. B. aus *Pa. pantotrophus*, im periplasmatischen Raum befinden würden. Die experimentelle Überprüfung dieser *in silico* Analysen wurde später in dieser Arbeit vorgenommen.

### 3.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von NirS, NirN und NirF

Wie bekannt ist, bindet NirS den Kofaktor Häm  $d_1$  (Nurizzo *et al.*, 1997). Die Proteine NirN und NirF aus *Pa. pantotrophus* zeigen die gleiche Fähigkeit (Zajicek *et al.*, 2009 und Bali *et al.*, 2010). Durch Aminosäuresequenzvergleiche der drei Proteine sollte daher überprüft werden, ob dieser geteilten Fähigkeit der Häm  $d_1$ -Bindung eine konservierte Häm  $d_1$ -Bindungsdomäne zugrunde liegt.

Proteinsequenzvergleiche mit Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) ergaben für die drei Proteine NirS, NirN und NirF die in Tabelle 3.1 aufgeführten Aminosäureidentitäten. Hier weisen NirF und NirN eine höhere Identität zueinander auf, als jeweils zu NirS. Die Identität zwischen

NirN und NirS liegt dabei noch etwas höher als zwischen NirF und NirS. Anzumerken ist, dass die hier vorgenommene *in silico* Analyse mit den prozessierten, also signalsequenzfreien, Aminosäuresequenzen durchgeführt wurde. Für die genaue Auflistung der Aminosäuresequenzen nach Entfernen der Transportsignalsequenz siehe auch Anhang A 1 a-c.

**Tabelle 3.1: Proteinsequenzidentitäten**

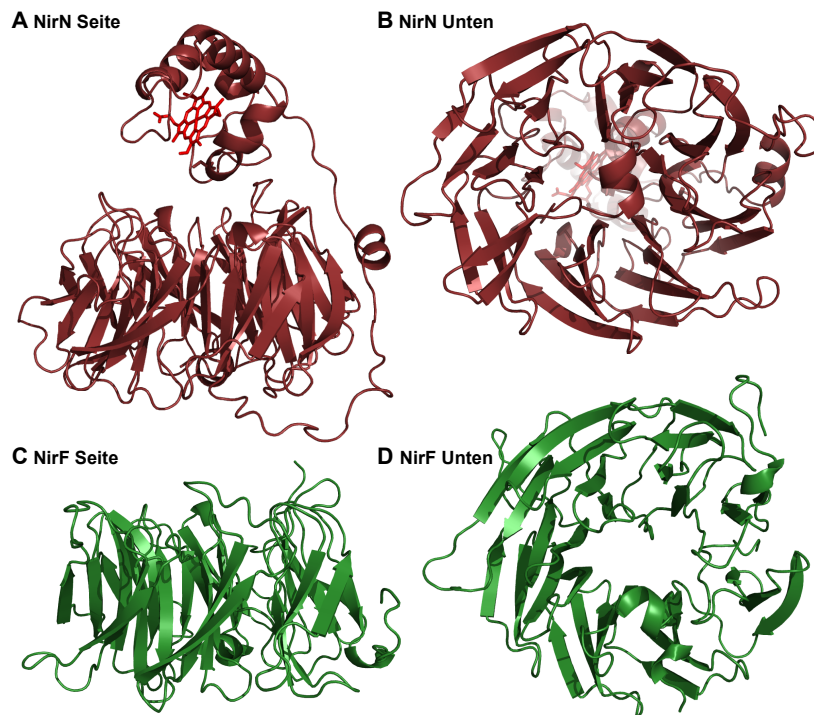
Protein 1	Protein 2	AS-Identität in %
NirF	NirS	21
NirN	NirS	23
NirF	NirN	29

NirF und NirN weisen, entsprechend der Tabelle 3.1, eine über 20%ige Identität zu NirS auf. Dieses kommt vor allem durch die Bereiche der Häm  $d_1$ -bindenden Domäne zustande, da hier die meisten identischen Aminosäuren zu finden sind. Die größere Identität zwischen NirN und NirS im Vergleich zu NirF und NirS ergibt sich dabei dadurch, dass diese beiden Proteine über die Häm  $c$ -bindende Domäne verfügen, die NirF dagegen nicht besitzt (Hasegawa *et al.*, 2001 und Nurizzo *et al.*, 1997). Daraus ergibt sich, dass die *P. aeruginosa* Proteine NirN und NirF, ebenso wie ihre Homologen aus *Pa. pantotrophus* (Zajicek *et al.*, 2009 und Bali *et al.*, 2010), in der Lage sein könnten Häm  $d_1$  bzw. einen Vorläufer davon zu binden. Um diese Hypothese weiter zu beleuchten, wurden als Nächstes Modellierungen der NirF- und NirN-Strukturen vorgenommen.

### 3.1.3 Strukturmodelle von NirF und NirN

Da es sich bei der Häm  $d_1$ -bindenden Domäne der NirS um eine auffällige  $\beta$ -Faltblattpropellerstruktur handelt (1.4.1, Nurizzo *et al.*, 1997), war davon auszugehen, dass sowohl NirF als auch NirN über eine solche Domäne verfügen müssten. Dies sollte anhand von Strukturmodellen überprüft werden.

Mit der Strukturmodellierungsoftware Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) konnten Modelle der Proteine NirF und NirN aus *P. aeruginosa* erzeugt werden. Diese richteten sich nach der zugrunde liegenden Struktur der NirS (Nurizzo *et al.*, 1997). Die in 3.1.2 dargestellten Aminosäuresequenzidentitäten zwischen NirS, NirN und NirF legen dar, dass die NirS-Struktur (Nurizzo *et al.*, 1997) eine gute Grundlage für ein Strukturmodellierung von NirF und NirN ist. Abb. 3.2 zeigt die generierten Strukturmodelle für NirN und NirF.



**Abbildung 3.2: Strukturmodelle von NirN und NirF aus *P. aeruginosa*.** Die Abbildung zeigt die Strukturmodelle von NirN (A und B) und NirF (C und D) jeweils in der Ansicht von der Seite (A und C) und von Unten (B und D). Modelliert wurden die Strukturen mit Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) und der NirS-Struktur (Nurizzo *et al.*, 1997) als Grundlagenmodell.

In Abbildung 3.2 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl das NirN-Modell als auch das NirF-Modell über einen  $\beta$ -Faltblattpropeller verfügt. Eine solche Domäne bildet in NirS die Binde-tasche für Häm  $d_1$ . Beide Strukturmodelle deuten außerdem darauf hin, dass innerhalb der Faltblatt-domäne ausreichend Platz für die Bindung des Häm  $d_1$ -Kofaktors bzw. Vorläufermo-leküls vorhanden wäre.

Wie Zajicek *et al.* im Jahr 2009 berichteten, ist NirN aus *Pa. pantotrophus* in der Lage, Häm  $d_1$  zu binden. Darüber hinaus wurde auf Grundlage von multiplen Aminosäuresequenzverglei-chen der NirN angenommen, dass es einen, wie im Modell gezeigten,  $\beta$ -Propeller auch in NirN<sub>*Pa.*</sub> gibt. Das Strukturmodell der NirF steht hinsichtlich des  $\beta$ -Propellers mit den von Bali *et al.* (2010) gemessen Zirkulardichroismus-Spektren der NirF aus *Pa. pantotrophus* im Ein-klang.

Die C-terminale Domäne der NirN zeigt ein gebundenes Häm c in Abb. 3.2 A. Dass es sich bei der NirN aus *P. aeruginosa* und *Pa. pantotrophus* um ein c-Typ Cytochrom handelt, wurde bereits von Hasegawa *et al.* (2001) und Zajicek *et al.* (2009) mit rekombinant produzierten Proteinen gezeigt. Das Modell in Abb. 3.2 A deutet an, dass diese C-terminale Domäne mög-licherweise durch eine sehr flexible Linkerregion mit der N-terminalen Domäne verbunden

ist. Zur genauen Bestimmung der Kristallstruktur von NirN wurden später in dieser Arbeit Kristallisationsexperimente vorgenommen.

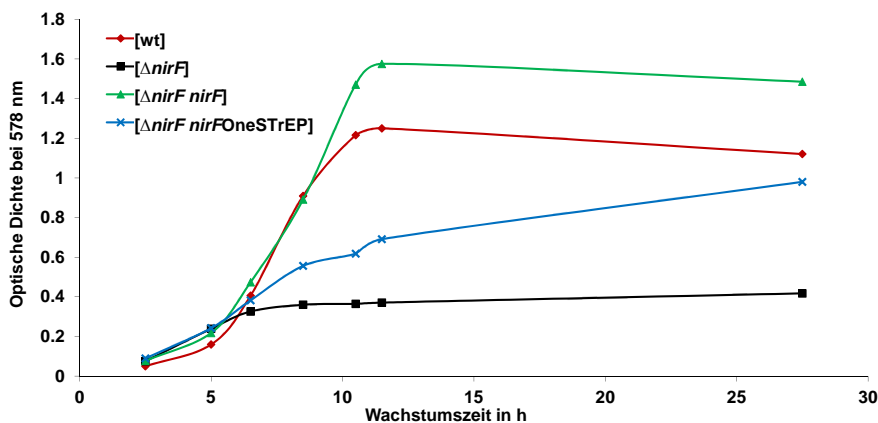
## 3.2 NirF - ein Lipoprotein in der inneren Membran

Die in Kapitel 3.1 aufgestellte Vermutung, dass es sich bei NirF um ein Lipoprotein in *P. aeruginosa* handeln könnte, sollte nun experimentell belegt werden. Dafür wurde zunächst ein NirF-Fusionsprotein zur Detektion des Proteins in Western-Blot-Analysen konstruiert. Anschließend wurde dieses Fusionsprotein auf seine *in vivo* Aktivität hin untersucht. Schließlich sollte überprüft werden, ob NirF membranassoziiert vorliegt, und wenn ja, ob es an der inneren oder äußeren Membran von *P. aeruginosa* gebunden ist.

### 3.2.1 Komplementierung einer *P. aeruginosa nirF*-Deletionsmutante mit verschiedenen NirF-Konstrukten

Die in 3.1 und der Studie von Remans *et al.* (2010) aufgestellte Hypothese der Membranlokalisierung von NirF in *P. aeruginosa* sollte experimentell überprüft werden. Aus diesem Grund wurden NirF-Fusionsproteine erzeugt (2.5), die die Detektion des Zielproteins NirF in Western-Blot-Analysen (2.8.3) über einen fusionierten Strep-Tag ermöglichen. Dazu wurden die Plasmide pUCP20*TnirF*, pUCP20*TnirF*OneSTrEP und pUCP20*TnirF*StrepII generiert (2.5) und in eine *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *nirF*-Mutante (Kawasaki *et al.*, 1995) eingebracht.

Da die Deletion von *nirF* zu einem stark ausgeprägten Wachstumsphänotyp unter anaeroben Bedingungen führt (Kawasaki *et al.*, 1997), sollte durch Wachstumskurven untersucht werden, ob der stark ausgeprägte Phänotyp der  $\Delta$ *nirF*-Mutante durch die rekombinanten NirF-Konstrukte aufgehoben werden kann. Dadurch sollten die verschiedenen NirF-Konstrukte auf ihre *in vivo* Funktionalität hin geprüft werden. Die Abbildung 3.3 zeigt Wachstumskurven, die unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM NaNO<sub>3</sub>, bei 37 °C und 120 rpm aufgenommen wurden (2.4.2, 2.4.3). Dabei wurden die folgenden Stämme miteinander verglichen: *P. aeruginosa* PAO1 wt mit pUCP20T [wt], *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *nirF* mit pUCP20T [ $\Delta$ *nirF*], *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *nirF* mit pUCP20*TnirF* [ $\Delta$ *nirF nirF*] und *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *nirF* mit pUCP20*TnirF*OneSTrEP [ $\Delta$ *nirF nirF*OneSTrEP]. Der mit pUCP20*TnirF*StrepII transformierte *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *nirF*-Stamm zeigte einen vergleichbaren Phänotyp wie der [ $\Delta$ *nirF nirF*OneSTrEP]-Stamm und ist deswegen nicht weiter aufgeführt.



**Abbildung 3.3: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$ -Stämmen unter anaeroben Bedingungen.** Die Abbildung zeigt Messungen des Wachstumsverhaltens unter anaeroben Bedingungen in LB-Medium mit 50 mM NaNO<sub>3</sub>, 37 °C und 120 rpm. Dazu wurden Proben zu den gezeigten Zeitpunkten entnommen und die OD<sub>578</sub>, wie in 2.4.3 beschrieben, gemessen (Mittelwerte aus Doppelbestimmung). Die abgebildeten Kurven entsprechen den folgenden *P. aeruginosa*-Stämmen: [wt] - PAO1 wt mit pUCP20T (rot); [ $\Delta nirF$ ] - PAO1  $\Delta nirF$  mit pUCP20T (schwarz); [ $\Delta nirF nirF$ ] - PAO1  $\Delta nirF$  mit pUCP20TnirF (grün); [ $\Delta nirF nirFOneSTrEP$ ] - PAO1  $\Delta nirF$  mit pUCP20TnirFOneSTrEP (blau).

Der Stamm [ $\Delta nirF$ ] zeigte das bereits von Kawasaki *et al.* im Jahr 1997 beschriebene Wachstumsverhalten und wuchs lediglich zu einer geringen optischen Dichte von 0,4 heran, wohingegen der [wt]-Stamm eine finale OD<sub>578</sub> von ca. 1,3 erreichte. Im Vergleich zum [wt]-Stamm zeigte der [ $\Delta nirF nirF$ ]-Stamm eine größere Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase sowie eine höhere Zelldichte ab ca. 9 h und in der stationären Phase. Der Stamm [ $\Delta nirF nirFOneSTrEP$ ] zeigte ein Wachstumsverhalten, das weder dem [wt]-Stamm noch dem [ $\Delta nirF$ ]-Stamm entsprach. Dieser Stamm wuchs zwar langsamer als der [wt]-Stamm aber deutlich besser als der [ $\Delta nirF$ ]-Stamm. Auffällig war eine lang anhaltende nahezu lineare Wachstumsphase mit stetiger Steigerung der Zelldichte über 28 h. Zu dieser Zeit befanden sich die anderen gezeigten Stämme bereits in der stationären bzw. Absterbephase.

Das verbesserte Wachstum des [ $\Delta nirF nirF$ ]-Stamms war im Vergleich zum [wt]-Stamm wahrscheinlich auf einen Wachstumsvorteil durch eine in der Zelle erhöhte NirF-Konzentration zurückzuführen. Bedingt dadurch, dass der gewählte Vektor eine konstitutive Expression des Zielgens erlaubte, lag das Produktionsniveau von Plasmid-kodiertem NirF vermutlich höher als das von genomkodiertem NirF im [wt]-Stamm. Zudem ist die Kopienzahl des Zielgens durch die Anzahl der im Stamm enthaltenen Vektorkopien höher als bei einem genomisch-integrierten *nirF*. Auf jeden Fall konnte das Wachstumsdefizit der  $\Delta nirF$ -Mutante durch die Produktion von Plasmid-kodiertem NirF behoben werden, was im Vergleich zum [wt]-Stamm

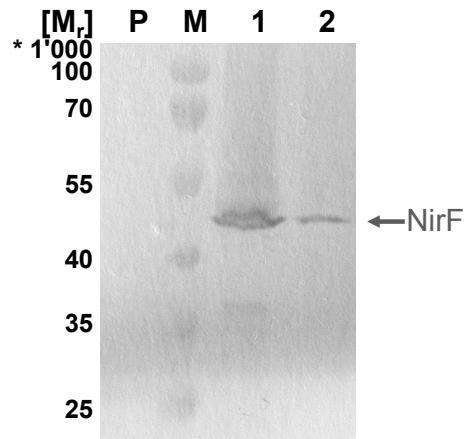
sogar zu einer Überkompensation führte. Im Gegensatz dazu führte die Produktion von Plasmid-kodiertem NirFOneSTrEP nur zu einer teilweisen Aufhebung des Wachstumsphänotyps der  $\Delta nirF$ -Mutante.

Die erzeugte Komplementation im [ $\Delta nirF$  nirFOneSTrEP]-Stamm zeigte ein signifikant langsames Wachstumsverhalten als der [wt]-Stamm. Allerdings war das Wachstum im Gegensatz zum [ $\Delta nirF$ ] deutlich verbessert. Dieses NirF-Konstrukt enthielt einen C-terminalen OneSTrEP-Tag. Möglicherweise störte dieser Tag die Aktivität des Proteins oder dessen Interaktionsmöglichkeiten zu anderen Proteinen des Kofaktortransports oder der Kofaktorbiosynthese, sodass es zu einer Einschränkung der Häm  $d_1$ -Biosynthese kam. Eine andere Erklärung für diesen Phänotyp könnte ein problematischer Transport des Zielproteins auf dem Sec-Transportweg sein, z. B. ausgelöst durch die Faltung des Tags im Cytoplasma. Dies würde zu niedrigeren Konzentrationen an NirF-Derivaten im Periplasma führen und darüber hinaus Einfluss auf die Zusammensetzung des bakteriellen cytoplasmatischen Kompartiments nehmen, z. B. durch Bildung von Proteinaggregaten. Dennoch kam es zu einem besseren Wachstum durch die Produktion des NirFOneSTrEP als in der  $\Delta nirF$ -Mutante selbst, was auf einen - zumindest kleinen - Teil NirF schließen ließ, der die Maturation zum Lipoprotein durchlief. Daher konnten die beiden Strep-getaggten Varianten zur Lokalisationsuntersuchung der NirF herangezogen werden.

### 3.2.2 Lokalisierung von NirF aus *P. aeruginosa*

Zunächst wurde untersucht, ob es durch den vorhergesagten Lipidanker von NirF<sub>P.a.</sub> zu einer Anreicherung des Proteins in der Gesamtzellmembranfraktion von *P. aeruginosa* kommt. Hierzu wurde der Stamm *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  mit pUCP20TnirFOneSTrEP anaerob für 8 h in LB-Medium mit 50 mM NaNO<sub>3</sub> bei 37 °C und 120 rpm kultiviert (2.4.2). Die geernteten Zellen (2.7.2) wurden zunächst wie in 2.6.1 beschrieben bearbeitet. Die Gewinnung der Gesamtzellmembranfraktion erfolgte nach 2.6.2. Darüber hinaus wurde ein periplasmatischer Proteinextrakt (2.7.3) dieses Stammes erzeugt. Die Proteine der Gesamtzellmembranfraktion und der Periplasmafraktion wurden (2.6.2) zunächst durch eine SDS-PAGE (2.8.2) getrennt und anschließend mittels Western-Blot-Analyse (2.8.3) auf Strep-getaggtes Fusionsprotein überprüft (2.8.3).

Die Abbildung 3.4 stellt die Western-Blot-Analyse dar, die deutlich zeigt, dass kein NirF in der periplasmatischen Fraktion (Spur P) nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber stand eine starke Anreicherung von NirF in der Gesamtzellmembranfraktion (Spur 1). Die Solubili-



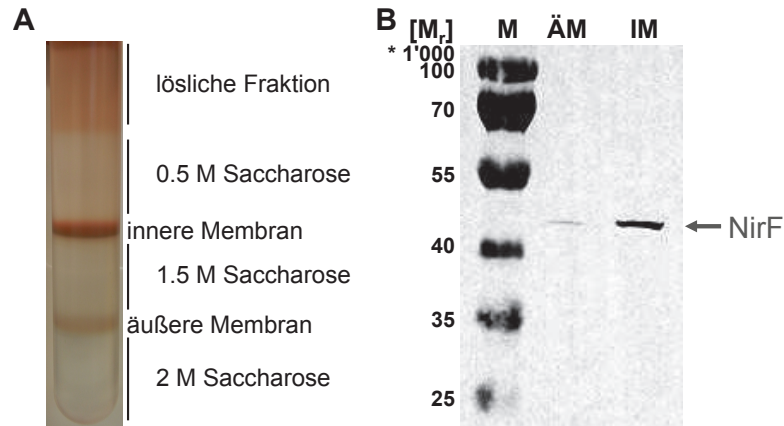
**Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse zur Lokalisation von NirF.** Die Abbildung zeigt eine Western-Blot-Analyse, die mit Strep-Tactin-AP-Konjugat entwickelt wurde. Hierbei stammen alle Proben von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  pUCP20TnirFOneSTrEP nach 8 h Wachstum in LB-Medium mit 50 mM NaNO<sub>3</sub> bei 37 °C und 120 rpm. Aus den geernteten Zellen wurden die Periplasmafraktion und die Gesamtzellmembranfraktion gewonnen. Die darin enthaltenen Proteine wurden mittels 12%iger SDS-PAGE dem relativen Molekulargewicht nach getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. **Spur P:** stellt die nach periplasmatischem Aufschluss erhaltene Probe dar. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). **Spur 1:** stellt eine Probe der präparierten Gesamtzellmembranfraktion dar. **Spur 2:** beinhaltet die Probe, die nach Solubilisieren der Proteine der Gesamtzellmembranfraktion erhalten wurde. Alle verwendeten Methoden sind im Kapitel „Materialien und Methoden“ aufgeführt. Das Zielprotein ist mit „NirF“ bezeichnet und wird durch einen Pfeil auf Höhe von ca. 49'000 angezeigt. Die relative Molekularmasse setzt sich dabei aus NirF (ca. 43'000) und dem OneSTrEP-Tag (ca. 6'000) zusammen.

sierung der Membranproteine (Spur 2) und die Detektion des Zielproteins in dieser Fraktion zeigte, dass ein Herauslösen des Zielproteins aus der Membranfraktion mit dem gewählten Puffer möglich war. Die niedrigere Konzentration der detektierten Bande in Spur 2 gegenüber Spur 1 ist auf Verdünnungseffekte zurückzuführen. Das Ergebnis zeigt klar, dass der durch Western-Blot-Analyse vorliegende, dominante Teil von NirFOneSTrEP an oder in der Gesamtzellmembran gebunden vorlag. Dies stellt gleichzeitig den ersten experimentellen Hinweis dar, der die *in silico* Analysen aus 3.1 unterstützt, nach denen es sich bei NirF<sub>Pa</sub> um ein Lipoprotein handeln könnte.

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob das membranständige Protein NirF in der inneren oder der äußeren Membran von *P. aeruginosa* lokalisiert ist. Dazu wurde *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  mit pUCP20TnirFStrepII für 8 h in LB-Medium mit 50 mM NaNO<sub>3</sub> bei 37 °C und 120 rpm kultiviert (2.4.2). Anschließend wurden die innere und äußere Membranfraktion von *P. aeruginosa* präpariert, die sich entsprechend ihrer Dichte zwischen den unterschiedlichen Fraktionen eines Saccharose-Gradienten einlagerten. Die Abbildung 3.5 zeigt die innere und äußere Membranfraktion nach einmaligem Zentrifugieren im isopyknischen Gradienten (A)



(2.6.3). Anschließend wurden die Proteine der beiden unterschiedlichen Membranfraktionen mittels SDS-PAGE getrennt und mit Western-Blot-Analyse (2.8.3) auf Strep-getaggte NirF hin untersucht (Abb. 3.5 B).



**Abbildung 3.5: Analyse der inneren und äußeren Membranfraktion von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ nirF mit pUCP20NirFStrepII.** A zeigt ein Foto der isopyknischen Gradientenzentrifugation, die wie im Kapitel 2.6.3 beschrieben durchgeführt wurde. Die innere und äußere Membranfraktion sind entsprechend hervorgehoben. B zeigt eine Western-Blot-Analyse der inneren und äußeren Membranfraktion wobei mittels Strep-Tactin-AP-Konjugat detektiert wurde. Dafür wurde zunächst *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ nirF mit pUCP20NirFStrepII unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Der Zellextrakt wurde durch eine isopyknische Gradientenzentrifugation in die lösliche Fraktion und die Fraktionen der inneren und äußeren Membran getrennt. Die Proteine der beiden Membranfraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt (12 % Trenngel) und mittels Western-Blot-Analyse untersucht. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur ÄM:** zeigt die Probe aus der äußeren Membranfraktion. **Spur IM:** zeigt die Probe der inneren Membran. Das Zielprotein ist mit NirF gekennzeichnet und durch einen Pfeil auf Höhe von 46'000 markiert. Die relative Molekularmasse setzt sich aus NirF (ca. 43'000) und dem StrepII-Tag (ca. 3'000) zusammen.

Die Fotografie in Abbildung 3.5 A zeigt die erfolgreiche Trennung der inneren und äußeren Membran von *P. aeruginosa* nach einer ersten isopyknischen Saccharose-Gradientenzentrifugation. Die innere Membran war deutlich an ihrer rotbraunen Farbe zu erkennen. Dies lag vor allem an den Kofaktoren der membranständigen Denitrifikationsproteine (NarI und NorBC - siehe auch 1.2.2).

Für die in Abb. 3.5 B dargestellte Western-Blot-Analyse wurden die beiden Membranfraktionen aus A nochmals einer weiteren Gradientenzentrifugation unterzogen. Die zweite Gradientenzentrifugation diente dazu, die beiden Membranfraktionen noch schärfer voneinander zu trennen. Wie in der Abbildung 3.5 B zu sehen ist, liegt ein deutlicher Überschuss von NirF-StrepII in der inneren Membranfraktion (IM) vor. Die Spuren von NirF-StrepII in der äußeren Membranfraktion (ÄM) lassen sich dadurch erklären, dass beim Aufschluss durch die French-

Press (2.6.1) die anliegende Scherkraft dazu führen könnte, dass membranassoziierte und membranständige Proteine aus der entsprechenden Membranfraktion herausgerissen werden könnten. Dies gilt vor allem für Proteine, die nur mit einem Lipidanker in der Membran eingebaut sind. Proteine, die über mehrere Transmembranhelices verfügen oder ein in der äußeren Membran integriertes  $\beta$ -Faltblattfasc darstellen, sind dagegen fester in der Membran verankert. Falls membranassoziierte oder gebundene Proteine während des Aufschlussprozesses tatsächlich aus der Membran herausgerissen wurden, so sollte eine erneute Integration in einer der zur Verfügung stehenden Membranen hauptsächlich statistisch erfolgen, da die Sortierungsprozesse (z. B. Lol-System - 1.3.3) in diesem *in vitro*-Zustand nicht mehr funktionieren. Abbildung 3.5 B zeigt, dass es sich bei NirF<sub>P.a.</sub> um ein in der inneren Membran verankertes Protein handelt. Dies ist zugleich der erste experimentelle Nachweis für eine solche Lokalisation. Zusammen mit der Signalsequenzanalyse (3.1) kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei NirF<sub>P.a.</sub> um ein Lipoprotein handelt, das auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran lokalisiert ist. Anhand der hier präsentierten Daten lässt sich also sagen, dass die in *P. aeruginosa* ablaufende Biosynthese von Häm  $d_1$  mit dem Biosyntheseweg aus z. B. *Pa. pantotrophus* (Bali *et al.*, 2011) zu vereinbaren ist, da nun auch die NirF<sub>P.a.</sub> dem periplasmatischen Raum zugeordnet werden kann.

Bereits von Kawasaki *et al.* (1997) wurde vorgeschlagen, dass es sich bei NirF um ein Häm  $d_1$ -Biosyntheseenzym handelt. Weiterhin liegt nahe, dass NirF aufgrund seiner periplasmatischen Lokalisation den letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese katalysiert (Bali *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass das Substrat von NirF (Dihydrohäm  $d_1$ ) vom Cytoplasma ins Periplasma transportiert werden muss. Ein für diesen Prozess zuständiger Transporter ist allerdings sowohl in *P. aeruginosa* als auch in anderen Denitrifizierern noch nicht bekannt (Bali *et al.*, 2011). Vermutlich nimmt NirF sein Substrat vom Transporter auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran auf, wofür die beiden Proteine wahrscheinlich miteinander interagieren müssen. Anschließend katalysiert NirF den letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese (Einführung der Doppelbindung in Propionatseitenkette an Ring D - Abb. 1.11), bevor der Kofaktor weitergegeben wird. Um weitere Experimente mit NirF, wie z. B. Enzymaktivitätstests oder Protein-Interaktionsstudien durchführen zu können, sollte in dieser Arbeit der Grundstein für solche Analysen gelegt werden. Dazu sollte im Anschluss eine Reinigung des Proteins ohne dessen Lipidanker erfolgen.

### 3.3 Proteinpräparation von NirF

Um NirF aus *P. aeruginosa* zu charakterisieren, sollte das Protein rekombinant produziert und gereinigt werden. Falls eine Reinigung möglich wäre, könnten mit NirF Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung realisiert werden, Antikörper gegen das Protein hergestellt und *in vitro* Studien, wie Enzymaktivitäts- oder Interaktionstests, durchgeführt werden.

#### 3.3.1 Konstrukte für die NirF-Präparation

Zunächst wurden verschiedene Konstrukte erzeugt, die eine rekombinante Produktion und Reinigung der *P. aeruginosa*-NirF durch Affinitätschromatographie ermöglichen sollten. Dabei wurde bewusst auf die Signalsequenz und die Lipobox des Proteins verzichtet, um ein besser lösliches Protein zu erhalten. Zwar führten die getesteten Konstrukte zu einer rekombinanten Produktion des Zielproteins in *E. coli*, allerdings erwiesen sich die erzeugten Proteine als unlöslich, banden nicht an die Säulenmatrix oder waren nach Reinigung instabil. Aus diesen Gründen wurde versucht die homologe NirF aus *Dinoroseobacter shibae* (NirF<sub>D.s.</sub>) rekombinant in *E. coli* herzustellen. Die NirF<sub>D.s.</sub> weist eine Signalsequenz auf, die über den Sec-Transportweg zu einem periplasmatisch löslichen Protein führen sollte, welches keinen Lipidanker trägt (Daten nicht gezeigt). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit ein lösliches Protein produzieren zu können. Die Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) erzeugte verschiedene Varianten des *nirF*<sub>D.s.</sub>-Gens mit für *E. coli* adaptierter *codon usage*. Diese Gene wurden in verschiedene Vektoren kloniert (2.5), sodass ein breites Spektrum an N- und C-terminal-getaggten Proteinen getestet werden konnte. Darüber hinaus wurden sowohl Signalsequenzen für den ko- und post-translationalen Transportweg zum Sec-Komplex getestet, als auch ein Test auf cytoplasmatische Produktion ohne Signalsequenz durchgeführt. Eine Auflistung der getesteten Konstrukte befindet sich in Anhang 2 Tabelle A.1.

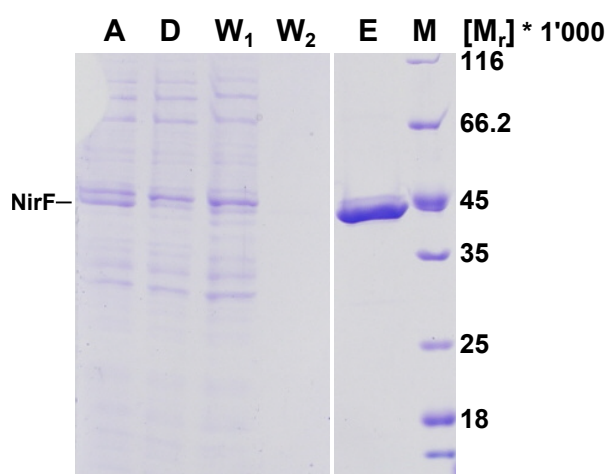
Schließlich erwies sich das Konstrukt pET22b*nirF*<sub>D.s.</sub>PCSStrepII als geeignet, um NirF zu produzieren und zu reinigen. Dieses Konstrukt verfügt über eine PelB-Signalsequenz sowie einen C-terminalen StrepII-Tag. PCS steht außerdem für eine Schnittstellensequenz der Protease Prescission (*Prescission cleavage site* - LEVLFQ/GP), die das Entfernen des C-terminalen Tags ermöglichen sollte.

### 3.3.2 Produktion von NirF

Die rekombinante Produktion von NirF<sub>D.s.</sub> in *E. coli* BL21 (DE3) mittels des Plasmids pET22b-nirF<sub>D.s.</sub>PCSSrepII wurde, wie in 2.7.1.4 beschrieben, durchgeführt. Dabei erwies sich eine Produktion bei niedrigen Temperaturen mit geringer Konzentration an IPTG (25  $\mu$ M) zur Induktion als zielführend, um ausreichend lösliches Protein zu erhalten. Die Kultivierung erfolgte in 4-6 L-Flüssigmedium. Nach der Zellernte wurde ein periplasmatischer Proteinextrakt hergestellt (2.7.3), welcher dann für die Reinigung von NirF<sub>D.s.</sub> eingesetzt wurde.

### 3.3.3 Strep-Tag-Affinitätschromatographie der NirF

Der NirF<sub>D.s.</sub>-haltige Proteinextrakt wurde, wie in 2.7.7.5 beschrieben, der affinitätschromatographischen Reinigung unterzogen. Während der Reinigung wurden von den durchgeführten Schritten, Auftrag auf die Säule (A), Durchlauf der Säule (D), Waschen der Säule (W1-2) und Elution der gebundenen Proteine (E) Proben für eine SDS-PAGE-Analyse (2.8.2) abgenommen und diesbezüglich präpariert. Die Analyse ist in Abbildung 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.6: SDS-PAGE-Analyse der Affinitätschromatographie von NirF<sub>D.s.</sub> nach Produktion in *E. coli* BL 21 (DE3).** Die Abbildung zeigt ein 12%iges Trenngel nach Färbung mit Coomassie-Lösung. Das Zielprotein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) mit pET22bnirF<sub>D.s.</sub>PCSSrepII wie beschrieben produziert. Die Proben wurden während des Reinigungsverlaufs abgenommen und für die SDS-PAGE-Analyse (2.8.2) vorbereitet. **Spur A:** Auftrag - periplasmatischer Extrakt. **Spur D:** Durchlauf - Proteine nach Passage durch die Affinitätssäule. **Spur W1:** Waschen 1 - Proteine der ersten Waschfraktion der Reinigung. **Spur W2:** Waschen 2 - Proteine der letzten Waschfraktion der Reinigung. **Spur E:** Elution - Probe der vereinigten Elutionsfraktionen der Reinigung. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). Das Zielprotein ist mit „NirF“ auf der Höhe von ca. 44'000 markiert und setzt sich aus NirF (ca. 41'000) und dem Strep-Tag (ca. 3'000) zusammen.

Das in Abbildung 3.6 gezeigte Gel einer SDS-PAGE-Analyse zeigt den Erfolg der durchgeführten Reinigung von NirF<sub>D.s.</sub>. Zunächst ist zu erkennen, dass die Bande, die einem Molekulargewicht von etwa 44'000 entspricht und die in Spur A noch gut zu sehen war, in Spur D nicht mehr auftrat. Dies spricht dafür, dass eine Bindung des Zielproteins an die Trennsäule erfolgte. Ebenso wiesen die Waschfraktionen (W1-2) keine deutliche Bande des Zielproteins auf. Somit löste sich das Zielprotein während der Waschschriffe nicht von der Säule ab. Darüber hinaus ist in Spur W2 zu sehen, dass die letzte Waschfraktion frei von ungebundenen Proteinen war. Dies bedeutet, dass das Waschvolumen ausreichend dimensioniert war. Die Elutionsfraktion zeigte eine nahezu hintergrundfreie Bande, die das Zielprotein NirF<sub>D.s.</sub> darstellte. Besonders hervorzuheben ist, dass keine Bande bei 60'000 präsent war, was für eine Bindung des Zielproteins zu dem Chaperon GroEL (60'000) sprechen würde. Die starke Interaktion zwischen GroEL und rekombinant produziertem NirF<sub>P.a.</sub> stellte das größte Problem bei der Reinigung von NirF<sub>P.a.</sub> dar (Daten nicht gezeigt). Mit dem hier verwendeten Konstrukt wurde also NirF<sub>D.s.</sub> ohne Chaperon zu hoher Reinheit gebracht.

Ein proteolytischer Verdau von NirF<sub>D.s.</sub> mit Prescission (2.7.7.5) konnte auf der Säule vor Elution nicht erfolgreich durchgeführt werden. Hierzu wurden lange Inkubationszeiten bis hin zu ü.N. benötigt, um einen nur unvollständigen Verdau herbeizuführen. Daher erfolgte der Verdau von NirF<sub>D.s.</sub> nach Elution für 2 h bei RT. Hierbei wurde ein Umsatz von ca. 85 % erhalten (Anhang 2, Abb. A.1).

Es bleibt festzuhalten, dass die Analysen aus den Kapiteln 3.1 und 3.2 zu neuen Erkenntnissen über NirF<sub>P.a.</sub> führten. Weiterhin konnte die NirF<sub>D.s.</sub> gereinigt werden und steht nun als ausgezeichnete Grundlage für weitere Versuche zur Verfügung. Die anschließenden Arbeiten werden von Julia Adamczack in dieser Arbeitsgruppe fortgeführt.

## 3.4 Proteinpräparation von NirS

Wie erwähnt wurde, handelt es sich bei NirS um ein gut charakterisiertes Protein. Aufklärungsbedarf bestand besonders bezüglich der Maturation dieses Enzyms, also dem Weg, auf dem die beiden Kofaktoren in das Protein eingebaut werden. Um diese Kofaktorinsertion zu untersuchen, sollte zunächst dafür die Häm *d*<sub>1</sub>-bindende holo-Form des Proteins (hNirS) gereinigt werden, um daraus den Kofaktor zu isolieren. Dieser könnte dann für weitere Experimente genutzt werden. Darüber hinaus sollte ebenso eine Häm *d*<sub>1</sub>-freie semi-apo-Form (saNirS) gereinigt werden, die als Grundlage zur Erzeugung von Antikörpern und für zukünf-

tige Häm  $d_1$ -Transferstudien zur Verfügung stehen sollte. Im Folgenden wird auf die Konstrukte zur saNirS-Produktion, die Produktionsbedingungen von saNirS und hNirS sowie die Reinigungen der Proteine eingegangen. Abschließend wird die Extraktion von Häm  $d_1$  gezeigt.

### 3.4.1 Konstrukte für die NirS-Präparation

#### 3.4.1.1 Konstrukte für die NirS-Produktion in *E. coli*

Aus den oben genannten Gründen musste zunächst ein Konstrukt erzeugt werden, das für die Produktion der Häm  $d_1$ -freien Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase genutzt werden konnte. In vorangegangenen Arbeiten wurde ein NirS-His<sub>6</sub>-Fusionsproteins erzeugt (Münch, 2009). Allerdings erwies sich dieses Fusionsprotein als ungünstig, da es zur raschen Präzipitation neigte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde zunächst ein pET22bnirS-Plasmid erzeugt (2.5). In diesem Konstrukt sollte eine N-terminale PelB-Signalsequenz für einen funktionierenden periplasmatischen Export des Zielproteins über den post-translationalen Weg des Sec-Transporters sorgen. Dieses rekombinant in *E. coli* zu exprimierende *nirS*-Gen besaß keine native *P. aeruginosa*-Signalsequenz und keine fusionierten Tags, sodass das produzierte Protein im Periplasma von *E. coli* in einer nativen, Häm  $d_1$ -freien Form vorlag.

#### 3.4.1.2 Konstrukte für die NirS-Produktion in *P. stutzeri*

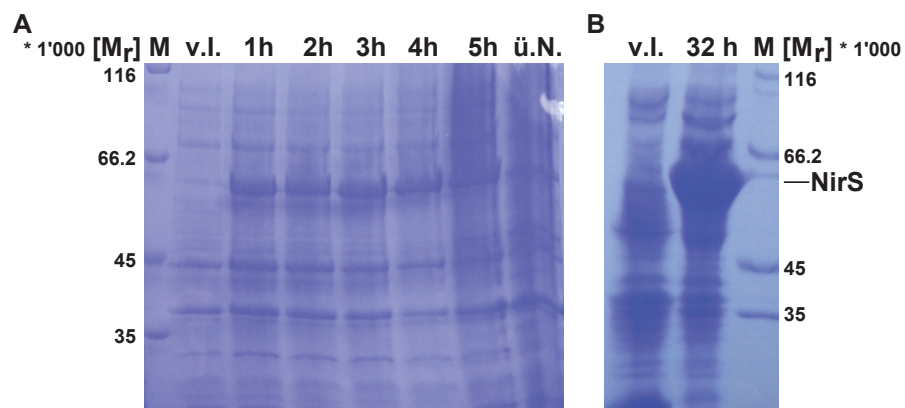
Das in Kapitel 2.7.1 beschriebene Produktionssystem in *P. stutzeri* wurde sowohl zur Produktion von hNirS (2.7.1.1) als auch von saNirS (2.7.1.2) verwendet. Hierbei wurde ein von Prof. F. Cutruzzolà freundlicherweise bereitgestellter *P. stutzeri* ZoBell MK202 mit pUCP-Nir-Stamm eingesetzt. In diesem Stamm wurde ein Transposon in das *nirS*-Gen eingebracht und somit dessen Expression verhindert. Das pUCP-Nir-Plasmid komplementierte den *P. stutzeri*-Stamm mit dem *P. aeruginosa nirS*-Gen (Arese *et al.*, 2003).

### 3.4.2 Produktion von NirS-Varianten

#### 3.4.2.1 Produktion von saNirS in *E. coli*

Für die Produktion der saNirS, welche ein c-Typ Cytochrom darstellt, in *E. coli* wurde ein *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm verwendet, der das Plasmid pEC86 (Arslan *et al.*, 1998) besaß. Dieses Plasmid trägt die Gene für die Proteine des Ccm I-Systems unter Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors, welcher eine konstitutive Expression erlaubt. Dadurch lassen sich re-

kombinant produzierte c-Typ Cytochrome in höheren Ausbeuten erhalten (Londer, 2011). Zunächst wurde eine Proteinproduktionsoptimierung für die Produktion der saNirS durchgeführt. Hierzu wurden die Produktionsbedingungen von Münch (2009), d. h. LB-Medium, Induktion mit IPTG und Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit pEC86 und pET22bnirShis<sub>6</sub>, mit autoinduzierendem Medium (2.3.1.3, 2.7.1.2) und Verwendung des Stamms *E. coli* BL21 (DE3) mit pEC86 und pET22bnirS verglichen. Abbildung 3.7 zeigt zwei SDS-PAGE-Gele mit einem Vergleich der beiden saNirS-Produktionen.



**Abbildung 3.7: SDS-PAGE-Analyse mit Proben aus verschiedenen Produktionen von rekombinanter saNirS in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86.** A zeigt die 12%ige SDS-PAGE einer Testproduktion von NirS-His<sub>6</sub>. Dabei wurden die pET22bnirShis<sub>6</sub> enthaltenden Zellen analog zu Münch (2009) in LB-Medium bei zunächst 37 °C und 200 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>578</sub> von ca. 0.5 wurde die Zielgenexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, anschließend wurden die Zellen bei 17 °C weiterkultiviert. Proben wurden zu entsprechenden Zeitpunkten abgenommen und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE analysiert (2.8.2). **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). **Spur v.I.:** Zeigt den Proteingehalt der Probe vor Zugabe von 1 mM IPTG und Temperaturveränderung auf 17 °C. **Spuren 1h-5h:** Zeigen die Proteine der Proben die 1, 2, 3, 4 und 5 h nach Induktion entnommen wurden. **Spur ü.N.:** Zeigt die Proteine einer Probe einer Kultivierung über Nacht. B zeigt die 12%ige SDS-PAGE einer Testproduktion mit dem gleichen Produktionsstamm aber mit pET22bnirS bei den in 2.7.1.2 beschriebenen Kultivierungsbedingungen. Proben wurden zu den gewählten Zeitpunkten abgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.8.2). **Spur v.I.:** Zeigt die Proteine einer Probe zu einem Zeitpunkt vor Temperaturveränderung. **Spur 32 h:** Zeigt die Proteine einer Probe 32 h nach Temperaturänderung. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). In A und B sind die Banden der Zielproteine entsprechend markiert. Dabei liegt die Bande in A auf Höhe von ca. 63'000 entsprechend einer Fusion aus NirS (60'000) und einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (3'000) und in B bei ca. 60'000 entsprechend der nativen NirS.

Die Unterschiede zwischen den beiden Produktionsverfahren sind in Abb. 3.7 deutlich zu erkennen. Die in Abb. 3.7 A gezeigte Produktion von saNirS-His<sub>6</sub> führte zwar zu einer deutlichen Bildung des Zielproteins (Spuren 1 h - ü.N.), dennoch ist zu sehen, dass bei langer Kultivierung (ü.N.) bereits eine Degradation der Zellen (Schmier in der Probenbahn) und

Abbau des enthaltenen Zielproteins (Verlust an Bandendicke) einsetzte. Dies zeigt, dass eine lange Kultivierung in LB-Medium nicht in Betracht gezogen werden konnte, sofern die Proteinausbeute gesteigert werden sollte. Die Proben zwischen 1-5 h wiesen wie erwähnt eine deutliche Produktion des Zielproteins auf, jedoch wurde hier beobachtet, dass sich die Kulturen lediglich bei einer OD<sub>578</sub> von 0.6-1.2 befanden. Dies würde bei einer Ernte der Zellen zu diesen Zeitpunkten zu wenig Biomasse pro eingesetztem Liter Medium führen.

Die Produktion in Abb. 3.7 B hingegen zeigte eine deutliche Zielproteinbande (saNirS) nach 32 h Kultivierung. Insgesamt schien mehr Zielprotein gebildet worden zu sein als in dem in Abb. 3.7 A gezeigten Experiment. Darüber hinaus wurde unter diesen Kultivierungsbedingungen eine Steigerung der Biomasse erzielt. Zum Zeitpunkt der Ernte besaß die Kultur in der Regel eine OD<sub>578</sub> zwischen 7 und 11. Aus diesem Grund wurde diese Methode zur saNirS-Produktion eingesetzt.

Dennoch gab es immer wieder Probleme mit dem Expressionssystem. Das pEC86-Plasmid (Arsalan *et al.*, 1998) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) eingesetzt, um unter aeroben Bedingungen das Cytochrom *c* Maturationssystem I (Ccm I - 1.4.2.3) nebst des Zielproteins zu ko-produzieren. Dies sollte einen Häm *c*-Einbau in das Zielprotein auch unter aeroben Bedingungen gewährleisten. Es war jedoch festzustellen, dass der Einbau des Kofaktors in das Zielprotein nicht verlässlich funktionierte. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der wahrscheinlichen Instabilität von pEC86 liegen, sodass es immer wieder zu einem Verlust der vermittelten Eigenschaften kam. Verschiedene Versuche die Zuverlässigkeit des Kofaktoreinbaus in *E. coli* zu erhöhen, z. B. Veränderung der Transformationsbedingungen oder zusätzliche Zugabe von Anhydrotetracyclin zur Verbesserung der *ccm*-Genexpression, blieben erfolglos. Aus diesem Grund wurde parallel in dieser Arbeit mit einem weiteren System zur saNirS-Produktion gearbeitet (2.7.1.2), bei dem *P. stutzeri* als Produktionsstamm diente.

Aus dem problematischen Häm *c*-Einbau lässt sich eine mögliche Erkenntnis zur Reihenfolge des Kofaktoreinbaus in NirS ableiten: NirS wurde gebildet, auch wenn der Kofaktoreinbau nicht erfolgte. Das Ausbleiben des Häm *c*-Einbaus führte jedoch immer zu einem unlöslichen Polypeptid, das - einem periplasmatischen Aufschluss nach - in kleinen Mengen im Periplasma vorlag. Dies lässt Schlüsse auf die Reihenfolge der unterschiedlichen Insertionsschritte der Kofaktoren (Häm *c* und Häm *d*<sub>1</sub>) in die NirS zu. Nachdem die apo-NirS ins Periplasma transportiert wurde, dürfte sich der Einbau des Häm *c*-Kofaktors anschließen. Dieser stellt eine deutliche Modifikation am Protein dar. Durch die Verknüpfung von Häm *c* mit dem Protein könnte eine mögliche Aggregatbildung zwischen Thiolfunktionen der Cysteine des CxxCH-



Motivs (Häm *c*-bindendes Motiv, Thöny-Meyer, 2002) verhindert werden. Eine ebensolche Aggregatbildung könnte ein unlösliches periplasmatisches Protein zur Folge haben. So ließe sich die unlösliche NirS erklären, die gebildet wird, sofern kein Häm *c* inseriert wurde. Dennoch wurde zu dem damaligen Zeitpunkt keine Untersuchung der N-terminalen Aminosäuresequenz angeschlossen, was eine definitive Aussage über die apo-NirS Lokalisierung ermöglicht hätte. Weitere Beobachtungen zur Stabilität der saNirS mit integriertem Häm *c* werden später in dieser Arbeit diskutiert und mit dieser Hypothese in Zusammenhang gebracht.

#### 3.4.2.2 Produktion von saNirS in *P. stutzeri*

Die rekombinante Produktion von saNirS in *P. stutzeri* ZoBell MK202 mit pUCP-Nir diente als Alternative zu der rekombinanten Produktion in *E. coli*. Der Vorteil hierbei bestand in der Zuverlässigkeit des Häm *c*-Einbaus in die NirS. Während *E. coli* nicht in der Lage ist, sein Ccm I-System unter aeroben Bedingungen zu nutzen, kann *P. stutzeri* auch in Anwesenheit von Luftsauerstoff darauf zurückgreifen und *c*-Typ Cytochrome bilden.

Das saNirS-Produktionsverfahren in *P. stutzeri* (2.7.1.2) unterschied sich in nur wenigen aber wichtigen Punkten von der hNirS-Produktion (2.7.1.1) im gleichen Stamm. Für die Produktion von saNirS musste auf die Induktion der Häm *d*<sub>1</sub>-Biosynthese verzichtet werden. Wie in 1.2.2 beschrieben wurde, erfolgt dies durch Sauerstoffmangel, Anwesenheit von Nitrat und Stickstoffmonoxid sowie durch *quorum sensing*-Moleküle (Toyofuku *et al.*, 2012b). Daraus ergab sich, dass im Falle der saNirS-Produktion in *P. stutzeri* auf die Zugabe von Nitrat zum Zeitpunkt der Induktion verzichtet werden musste und auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung geachtet werden musste (vergleiche auch 3.4.2.1). Daher wurde bei diesem Verfahren auf das Vereinigen von zwei Kultivierungsansätzen zur Erzeugung eines mikroaeroben Milieus verzichtet.

#### 3.4.2.3 Produktion von hNirS in *P. stutzeri*

Um den Kofaktor Häm *d*<sub>1</sub> zu gewinnen, musste zunächst eine holo-NirS produziert werden, um im Anschluss eine Reinigung des Proteins durchzuführen und den Kofaktor aus der NirS herauszulösen. Hierzu wurde *P. stutzeri* ZoBell MK202 mit pUCP-Nir unter semi-aeroben Bedingungen kultiviert (2.7.1.1). Diese Methode wurde 2003 von Arese *et al.* beschrieben und durch Schnitzer (2011) variiert. Im Unterschied zur saNirS-Produktion in *P. stutzeri* wurde hier zum Zeitpunkt der Induktion dem Medium zusätzlich Kaliumnitrat zugeführt, um die Häm *d*<sub>1</sub>-Biosynthese zu steigern. Durch Vereinigung zweier Kulturen zum Zeitpunkt der In-

duktion wurde das Leervolumen des Erlenmeyerkolben so verringert, dass weniger Sauerstoff in die Kultur eingebracht und so ein mikroaerobes Milieu erzeugt wurde. Diese Veränderungen führten zur Biosynthese von Häm  $d_1$  und dessen Einbau in die NirS.

#### 3.4.2.4 Zellaufschluss

Nachdem die NirS produzierenden Zellen geerntet wurden (2.7), zeigte sich im Falle der saNirS-Produktionen jeweils ein hellrotes Bakterienzellpellet. Die Produktion von hNirS hatte eine rotbraune Farbe des Zellpellets zur Folge. Der Kultivierungsmaßstab zur Produktion von saNirS in *E. coli* betrug in der Regel 6 L (2.7.1.2). Sofern saNirS rekombinant in *P. stutzeri* produziert wurde, wurde die Biomasse aus mindestens 10 L-Kultur zur Reinigung genutzt (2.7.1.2). Der Kultivierungsmaßstab für hNirS in *P. stutzeri* betrug in der Regel zehn Liter (2.7.1.1). Die Reinigung von hNirS wurde aus mindestens zwei vereinigten Produktionen, also mindestens der Biomasse von 20 L-Kultur, durchgeführt (Schnitzer, 2011).

Für alle Reinigungen wurden die Zellen mittels French Press (2.7.4) aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt besaß in der Regel ein Volumen zwischen 150-300 mL und wurde nach dem Abtrennen von Zelltrümmern durch Zentrifugation entsprechend der beschriebenen Methode (2.7.7.1) gegen Puffer-A ü.N. dialysiert.

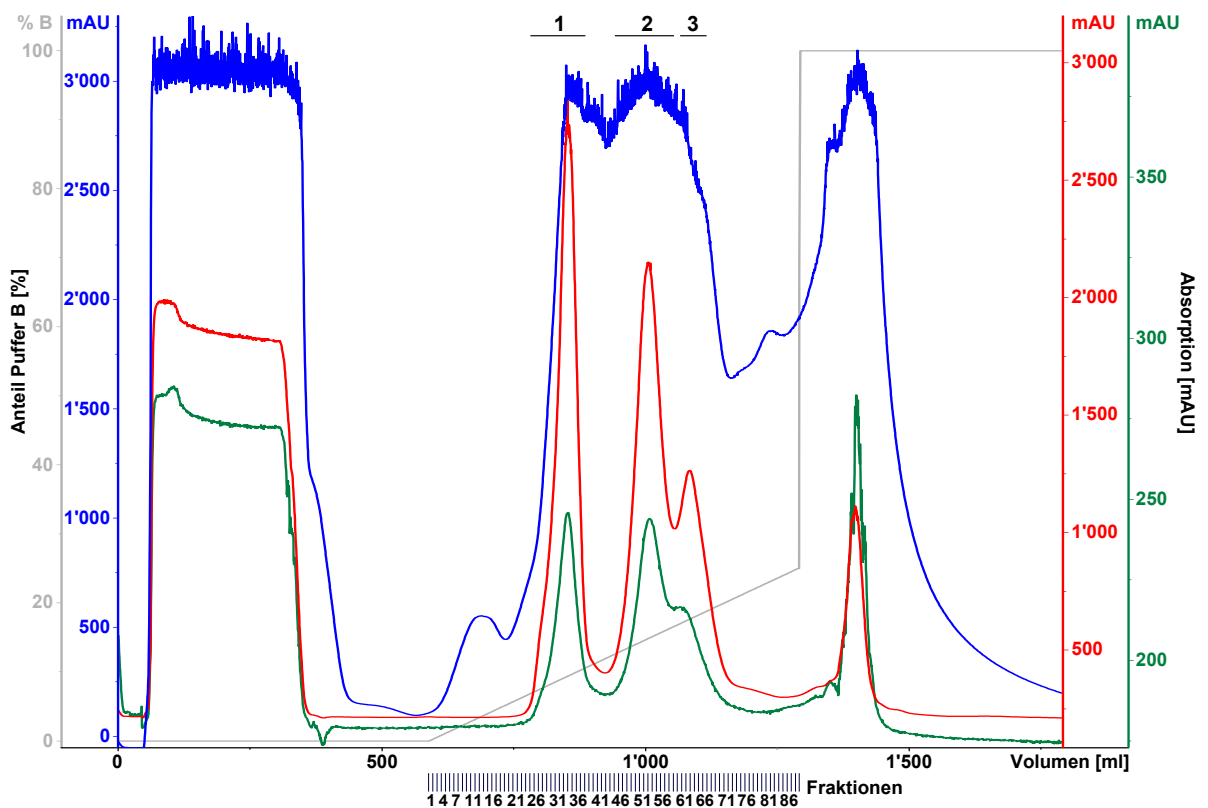
### 3.4.3 Reinigung der holo-NirS

Zur Reinigung der hNirS war ein zweistufiges Reinigungsprotokoll (verändert nach Parr *et al.*, 1976) notwendig, das im Folgenden näher beschrieben wird und mit Hilfe von Tobias Schnitzer durchgeführt wurde (Schnitzer, 2011). Die Reinigungen von saNirS und NirN, deren Beschreibungen später erfolgen, wurden analog durchgeführt.

#### 3.4.3.1 hNirS-Anreicherung mittels Anionenaustauscherchromatographie

Der dialysierte zellfreie Proteinextrakt wurde entsprechend der in 2.7.7.2 beschriebenen Methode einer Anionenaustauscherchromatographie unterzogen. Diese diente zur ersten Anreicherung des Zielproteins. Dabei wurde ein Chromatogramm des Reinigungsverlaufs aufgezeichnet (Abbildung 3.8), wobei die eluierenden Proteine bei drei verschiedenen Wellenlängen detektiert wurden. Proteine besitzen eine Absorption bei 280 nm aufgrund der aromatischen Aminosäuren, somit konnte diese Wellenlänge als Indikator für die eluierten Proteine genutzt werden (blaue Linie). Die Soretbande von c-Typ Cytochromen besitzt ein Absorptions-

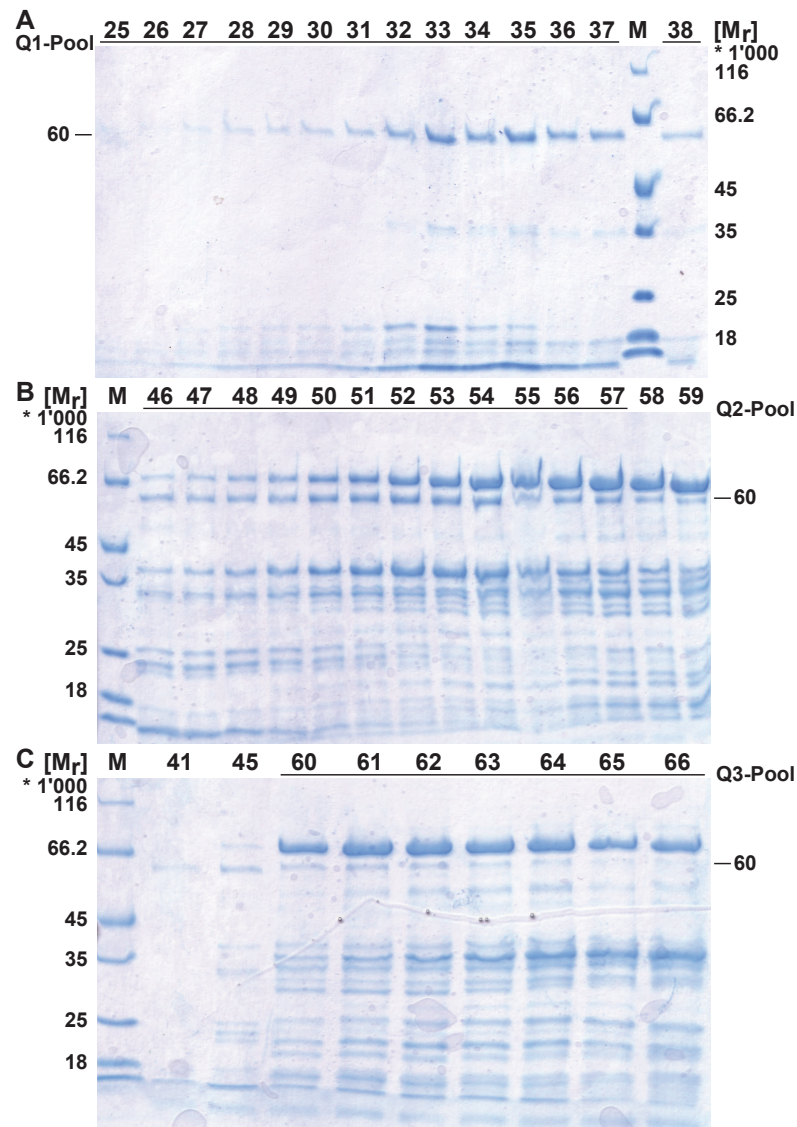
maximum zwischen 400 und 420 nm, was dazu führte, dass durch Detektion der Absorption bei 410 nm (rote Linie) die eluierten Cytochrome *c* gemessen werden konnten. Der in NirS gebundene Häm *d*<sub>1</sub>-Kofaktor weist ein Absorptionsmaximum bei ca. 640 nm auf, wodurch die Detektion bei 644 nm (grüne Linie) für die holo-Form der Nitritreduktase genutzt werden konnte (für Absorptionsspektren von hNirS siehe auch: Barber *et al.*, 1976 und Weeg-Aerssens *et al.*, 1991). Da die hNirS ein Protein darstellt, welches sowohl Häm *c* als auch Häm *d*<sub>1</sub> enthält, sollte seine Elution von der Säule also dadurch gekennzeichnet sein, dass die Absorption bei allen drei Wellenlängen (280 nm, 410 nm und 644 nm) simultan ansteigt.



**Abbildung 3.8: Chromatogramm der Anionenaustauscherchromatographie von hNirS.** Die chromatographische Trennung wurde mit einer 100 mL Q-Sepharose FastFlow Säule entsprechend des in Kapitel 2.7.7.2 beschriebenen Protokolls durchgeführt. Dabei wurden ca. 280 mL dialysierter und zelltrümmerfreier Proteinextrakt zur Anreicherung des Zielproteins hNirS eingesetzt. Der gesamte Methodenverlauf umfasste 1'700 mL, aufgeteilt auf Probenauftrag (0-380 mL), Waschschrutt (380-600 mL), Elution im linearen NaCl-Gradienten (600-1'300 mL) und Reinigungsschritt der Säule (1'300-1'700 mL). Dabei wurde die Chromatographie mit 100 % Puffer-A gestartet und im Laufe der Methode eine steigende Konzentration Puffer-B eingesetzt. Der prozentuale Anteil von Puffer B ist auf der y-Achse des Chromatogramms angezeigt. Das Eluat wurde zu 8 mL fraktioniert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. **Blau:** Absorption bei 280 nm. **Rot:** Absorption bei 410 nm. **Grün:** Absorption bei 644 nm. **Grau:** steigende Konzentration an Puffer B. Die Peaks 1-3 sind entsprechend markiert. (Schnitzer, 2011).

Das in Abbildung 3.8 dargestellte Chromatogramm zeigt zunächst den Probenauftrag bis ca. 380 mL. Dieser setzt sich aus dem Totvolumen der Säule (ca. 100 mL) und 280 mL Probe zusammen. Unter den hier gewählten Pufferbedingungen (2.7.7.2) band bereits ein großer Teil der bakteriellen Proteine nicht an die Säule und konnte im Durchlauf aufgefangen werden. Der im Anschluss ablaufende Waschvorgang sorgte für das Auswaschen aller nicht gebundenen Proteine und schließlich für eine Erniedrigung aller Absorptionslinien. Dabei gingen die Absorptionen von 410 nm und 644 nm auf die Nulllinie vor Probenauftrag zurück, während die allgemeine Proteinabsorption über ein halbes Säulenvolumen (SV) zwischen 420 und 470 mL konstant war. Da ein zu langes Spülen zum Auswaschen der Probe oder Verbreiterung der Elutionsfraktionen führen kann, wurde nach Erreichen einer konstanten Basislinie bei 280 nm der Elutionsvorgang begonnen. Dabei stieg die Konzentration von NaCl (graue Linie) enthaltendem Puffer-B von 0 auf 25 % über 7 SV an. Dies entsprach einer Salzkonzentration von 0 mM zu Beginn und 250 mM am Ende der Elution. Während der Elution waren vor allem drei Peaks mit den Wellenlängen 410 nm und 644 nm zu erkennen. Peak 1 wurde in den Fraktionen 25-38, Peak 2 in den Fraktionen 45-59 und Peak 3 in den Fraktionen 60-68 zu jeweils 8 mL pro Fraktion gesammelt. Die allgemeine Proteinabsorption von 280 nm befand sich im Bereich der ersten zwei Peaks am Detektormaximum und war daher wenig aussagekräftig. Nach der Elution schloss sich ein Säulenreinigungsschritt an, bei dem mit 1 M NaCl die Elution von noch an der Säule gebundenen Proteinen erfolgte. Das Chromatogramm zeigt diesen Schritt im Bereich von 1'300 mL bis 1'700 mL. Hier kam es noch einmal zu einem deutlichen Anstieg der Proteinabsorption bei 280 nm. Dieses Eluat wurde nicht weiter fraktioniert. Die zu den Peaks 1-3 gehörenden Fraktionen wiesen unterschiedlich stark ausgeprägte rotbraune Färbungen auf. Diese Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE (2.8.2) und Western-Blot-Analysen (2.8.3) auf das Vorhandensein von NirS überprüft. Abbildung 3.9 zeigt die SDS-PAGE-Analysen der drei Elutionspeaks mit einigen ausgewählten Fraktionen.

Die drei in Abbildung 3.9 gezeigten SDS-PA-Gele zeigen die Analyse des Proteingehalts der Fraktionen 25-38 (Peak 1; Abb. 3.9 A), 41, 45-59 (Peak 2; Abb. 3.9 B und C) und 60-66 (Peak 3; Abb. 3.9 C). Die Bande bei einer relativen Molekularmasse von 60'000, die dem Zielprotein NirS der Größe nach entspricht, ist markiert. Gel A zeigt die Analysen der Fraktionen des Peak 1. Entsprechend dem Absorptionsverlauf des Chromatogramms war ein Anstieg der Zielproteinkonzentration bis zum Peakmaximum hin zu erkennen. Die höchste Konzentration an hNirS befand sich in den Fraktionen 33-35. Die anschließend abnehmende Intensität der Bande bei 60'000 (Abb. 3.9 A, 35-38) war mit der Abnahme von Peak 1 aus Abb. 3.8 vereinbar.



**Abbildung 3.9: SDS-PAGE-Analysen der Peaks 1-3 aus der Anionenaustauscherchromatographie von hNirS.** Die Abbildung zeigt drei 12%ige Trenngele nach Färbung mit Instant Blue (A-C). Die Proben entstammen dabei den nummerierten Elutionsfraktionen der Anionenaustauscherchromatographie von hNirS. Alle Proben wurden zu gleichen Mengen aufgetragen. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spuren 25-66:** Proben der Elutionsfraktionen 25-66. Die Bande auf Höhe des Zielproteins (60'000) ist hervorgehoben. Die Fraktionen 25-38 wurden zum Q1-Pool vereinigt. Der Q2-Pool setzte sich nach Vereinigung aus den Fraktionen 46-57 zusammen. Der Pool Q3 besteht aus den Fraktionen 60-66 und bildet zugleich den Pool mit geringster Konzentration an Zielprotein. (Schnitzer, 2011).

Die im Gel gekennzeichneten Fraktionen 28-38 wurden zum Q1-Pool (88 mL) vereinigt. In Gel B und C sind die Analysen der Fraktionen 41, 45-66 zu sehen. Spur 41 entsprach dabei einer Probe aus dem Bereich der Chromatographie zwischen Peak 1 und 2. Es ist deutlich zu erkennen, dass in dieser Probe nur sehr wenig Protein auf Höhe der 60'000-Bande vorhanden war. Erst ab Fraktion 45 kam es wieder zu einer deutlich erkennbaren Bande bei 60'000

in der SDS-PAGE. Die Spuren 46-57 entsprachen den Fraktionen, die zum Q2-Pool vereinigt wurden. Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Fraktionen mehr Verunreinigungen aufwiesen als die Fraktionen des Q1-Pools. Vor allem die Banden bei ca. 35'000 und 70'000 stellten die stärksten Verunreinigungen dar. Obwohl in den Fraktionen 58 und 59 eine Proteinbande bei 60'000 zu erkennen war, wurde darauf verzichtet diese in den vereinigten Q2-Pool (96 mL) aufzunehmen, da hier zu viele andere Proteinbanden vorlagen.

In Gel C waren die Proben des dritten Peaks der Chromatographie aufgetragen. Dabei war zu erkennen, dass die Intensität der Bande des Zielproteins hier nur sehr gering ausfiel. Besonders die Proteine mit Banden bei 35'000 und 70'000 stellten enorme Verunreinigungen dar. Dennoch wurde aus diesen Fraktionen ein Q3-Pool (64 mL) erzeugt.

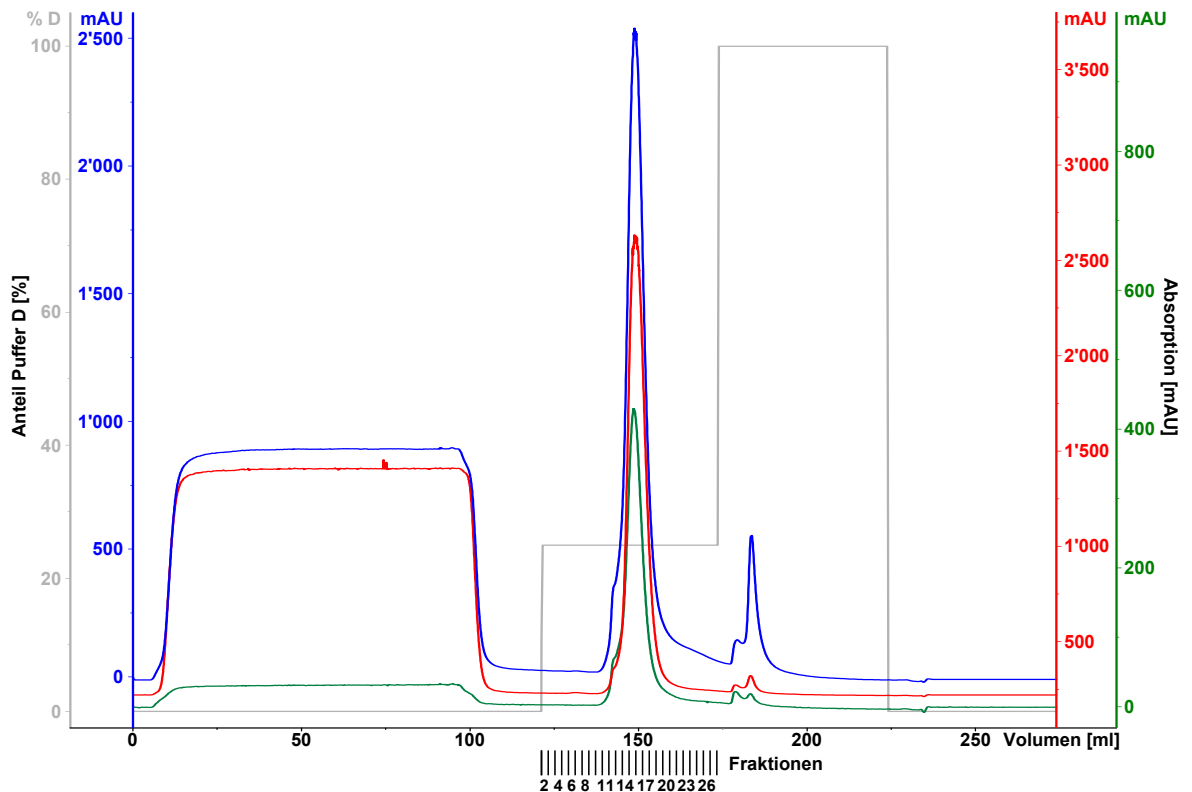
Die Pools Q1-Q3 wurden jeweils gegen Puffer C dialysiert (2.7.7.1), um sie separat einem weiteren Reinigungsschritt mittels Kationenaustauscherchromatographie (2.7.7.3) zu unterziehen. Die Kationenaustauscherreinigung diente dazu, den Gehalt an Verunreinigungen, aufgrund ihres zur NirS unterschiedlichen Trennverhaltens auf der Säule, zu vermindern.

### 3.4.3.2 hNirS-Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie

Die dialysierten Pools Q1-Q3 wurden getrennt voneinander einer Kationenaustauscherchromatographie unterzogen (2.7.7.3). Die Absorptionsverläufe bei 280 nm (blau), 410 nm (rot), und 644 nm (grün) wurden während der Chromatographie aufgezeichnet. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch den Chromatographieverlauf des Q1-Pools.

Hierbei war zunächst der Probenauftrag von Q1 (ca. 90 mL) bis ca. 100 mL (Q1 + Totvolumen 10 mL) zu erkennen. Dabei stiegen insbesondere die Absorptionen bei 280 nm und 410 nm an. Da die Absorption bei 644 nm nahe der Nulllinie verlief, konnte angenommen werden, dass die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase an der Säule gebunden blieb. Nachdem mit Puffer C für weitere 2 SV gewaschen wurde und dabei die Absorptionen konstant blieben, wurde mit der Elution begonnen. Hierbei wurde durch eine direkte Erhöhung der Konzentration von Puffer D (1 M NaCl) auf 25 % (250 mM NaCl) die Elution des Zielproteins herbeigeführt. Das Zielprotein war an einem distinkten Peak mit den Absorptionsmaxima bei 280 nm, 410 nm und 644 nm zu erkennen. Das Eluat wurde zu 2 mL fraktioniert und durch eine SDS-PAGE (2.8.2) analysiert. Zum Abschluss der Methode wurde das Eluieren von anderen, noch an der Säule gebundenen Proteinen durch Erhöhung der Puffer D-Konzentration auf 100 % herbeigeführt.

Bevor die weiteren Pools Q2 und Q3 analog gereinigt werden konnten, wurde die Säule ent-



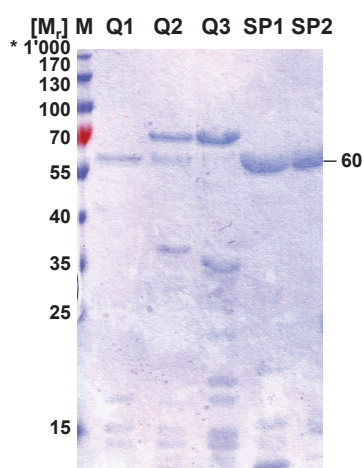
**Abbildung 3.10: Chromatogramm der Kationenaustauscherchromatographie von hNirS.** Die chromatographische Trennung wurde mit einer 10 mL SP-Sepharose FastFlow Säule entsprechend des in Kapitel 2.7.7.3 beschriebenen Protokolls durchgeführt. Dabei wurden ca. 90 mL dialysierter Q1-Pool zur Reinigung des Zielproteins hNirS eingesetzt. Der gesamte Methodenverlauf umfasste ca. 225 mL, aufgeteilt auf Probenauflauf (0-100 mL), Waschschrift (100-120 mL), Elution (120-175 mL) und Reinigungsschritt der Säule (175-225 mL). Dabei wurde die Chromatographie mit 100 % Puffer-C gestartet. Für die Elution wurde 25% Puffer D zugemischt. Der prozentuale Anteil von Puffer D ist auf der y-Achse des Chromatogramms angezeigt. Das Eluat wurde zu 2 mL fraktioniert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. **Blau:** Absorption bei 280 nm. **Rot:** Absorption bei 410 nm. **Grün:** Absorption bei 644 nm. **Grau:** steigende Konzentration von Puffer D. (Schnitzer, 2011).

sprechend der in 2.7.7.3 angegebenen Schritte neu konditioniert, was in Abb. 3.10 in dem Bereich ab 225 mL bis zum Ende des Chromatogramms dargestellt ist. Die Fraktionen aus dem Bereich des Elutionspeaks wiesen unter diesen Pufferbedingungen (pH 6.4) eine grünbraune Färbung auf und wurden zu den Pools SP1 (aus der Reinigung von Q1), SP2 (aus Q2) und SP3 (aus Q3) vereinigt. Die SP-Pools besaßen die in Tabelle 3.2 dargestellten Volumina und Konzentrationen. Dabei ist ersichtlich, dass insgesamt ca. 28 mg Protein in 21 mL gereinigt werden konnte.

**Tabelle 3.2: Proteinkonzentrationen der SP-Pools (Schnitzer, 2011)**

Pool	Konz. in mg/mL	Vol. in mL	Proteinmenge in mg
1	1.2	8.9	10.2
2	1.4	6.8	9.7
3	1.5	5.3	8.1

Eine SDS-PAGE-Analyse, die die Reinheit der SP-Pools 1 und 2 aufzeigte und einen Vergleich zur Reinheit der Q-Pools 1-3 darstellte, ist in Abbildung 3.11 abgebildet. Die Probenvorbereitung erfolgte dabei nach der in 2.8.2 beschriebenen Methode.



**Abbildung 3.11: SDS-PAGE-Analyse von den Q- und SP-Pools der hNirS Reinigung.** Die Abbildung zeigt ein 12%iges Trenngel nach Färbung. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spuren Q1-3:** Vereinigte Fraktionen nach der Anionenaustauscherchromatographie Q1-3. **Spuren SP1-2:** Vereinigte Fraktionen der Kationenaustauscherchromatographien SP1-2. Die Bande bei 60'000 ist markiert, diese entspricht der relativen Molekularmasse des Zielproteins NirS (Schnitzer, 2011).

Abbildung 3.11 zeigt, dass im Verlauf von Anionenaustauscherchromatographie (Q-Pools) zu Kationenaustauscherchromatographie (SP-Pools) eine deutliche Reinigung des Zielproteins erzielt werden konnte. Hierbei stellte sich eine höhere Konzentration des Zielproteins in den SP-Pools ein, die mit einer deutlichen Minderung der Banden bei ca. 70'000 und ca. 35'000 einherging. Die Identität des Zielproteins als NirS in allen drei SP-Pools konnte durch N-terminale Proteinsequenzierung (2.8.4) bewiesen werden (Schnitzer, 2011). Das hier durchgeführte Ionenaustauscherprotokoll führte somit zu einer erfolgreichen Reinigung der hNirS, die als gereinigtes Protein zur Extraktion von Häm  $d_1$  zur Verfügung stand.

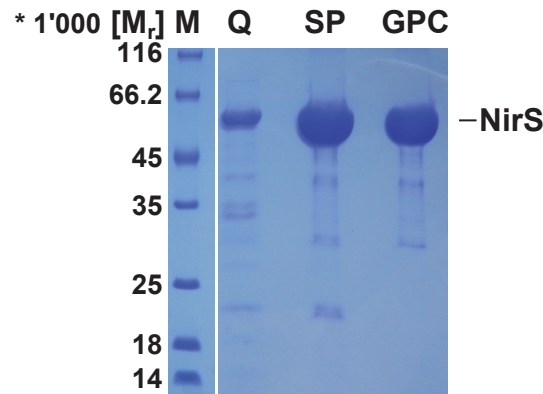


### 3.4.4 Reinigung der semi-apo-NirS

Da die Reinigung der saNirS analog zu der Reinigung der hNirS verlief, wird hier lediglich zusammenfassend auf die Reinigung der saNirS eingegangen. Das ausführliche Reinigungsprotokoll der ersten zwei Stufen der Reinigung ist für hNirS dargestellt (3.4.3).

Der größte Unterschied zwischen den Reinigungen der hNirS und saNirS bestand in der Detektion bei der Wellenlänge von 644 nm. Da in der saNirS der Häm  $d_1$ -Kofaktor nicht vorlag, wurde auf die Detektion bei dieser Wellenlänge verzichtet und es erfolgte nur eine Aufzeichnung der Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 410 nm (Soret-Bande, Cytochrom c). Die Reinigung der saNirS begann mit der Anreicherung von saNirS mittels Anionenaustauscherchromatographie (2.7.7.2). Hierzu wurde der zellfreie Extrakt nach Dialyse (2.7.7.1) auf die Q-Sepharose-Anionenaustauschersäule appliziert. Nach dem Waschen der Säule, entsprechend der Angaben in 2.7.7.2, erfolgte die Elution der saNirS in einem linearen Gradienten auf 25 % des Elutionspuffers (250 mM NaCl). Das Eluat wurde zu Fraktionen von 8 mL gesammelt. Bei der Reinigung von saNirS kam es, im Gegensatz zur hNirS, nur zu einem Elutionspeak, der ein Absorptionsmaximum bei 410 nm zeigte. Die Fraktionen dieses Peaks wurden aufgefangen und zeigten eine rote Farbe. Daraufhin wurden diese zum Q-Pool vereinigt und einer zweiten Dialyse (2.7.7.1) zur Vorbereitung für die Kationenaustauscherchromatographie unterzogen. Der dialysierte Q-Pool konnte am folgenden Tag auf die SP-Sepharose-Kationenaustauschersäule aufgebracht und dem in 2.7.7.3 beschriebenen Reinigungsprotokoll unterzogen werden. Dabei wurden wieder die Absorptionen bei 280 nm und 410 nm detektiert. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten auf 25 % Puffer-D. Dabei wurde ein Elutionspeak mit Absorptionen bei 280 nm und 410 nm detektiert. Das Eluat wurde in 2 mL-Fractionen gesammelt, wobei die dem Elutionspeak entsprechenden Fraktionen eine rote Färbung aufwiesen. Diese Fraktionen wurden zum SP-Pool vereinigt. Die abschließende Durchführung einer präparativen Gelpermeationschromatographie (2.7.7.4) führte zu einer weiteren Reinigung der saNirS. Dabei wurden erneut rote Proteinfractionen erhalten, die mittels SDS-PAGE (2.8.2) analysiert wurden. Die Fraktionen mit der Bande bei 60'000 relativer Molekularmasse wurden zum GPC-Pool vereinigt. Abbildung 3.12 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse (2.8.2) der Proteinlösungen, die den vereinigten Fraktionen nach Anionenaustauscher-, Kationenaustauscher- sowie Gelpermeationschromatographie entsprachen.

Wie in Abb. 3.12 zu sehen ist, erfolgte eine kontinuierliche Erhöhung des Reinheitsgrades der saNirS, die in diesem Beispiel nach Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bnirS



**Abbildung 3.12: SDS-PAGE-Analyse der drei Reinigungsschritte der saNirS aus *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bnirS.** Die Proteinproduktion und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 2.7.7 dargestellt. Die SDS-PAGE-Analyse (12 % Trenngel, Coomassie-Färbung) zeigt die nach den verschiedenen Schritten der Reinigung erhaltenen vereinigten Fraktionen. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur Q:** Vereinigte Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie. **Spur SP:** Vereinigte Fraktionen nach Kationenaustauscherchromatographie. **Spur GPC:** Vereinigte Fraktionen nach Gelpermeationschromatographie. Die Bande bei 60'000 ist als NirS Bande angezeigt.

erhalten wurde. Während die Reinheit der saNirS durch die Kationenaustauscherchromatographie nochmals deutlich gesteigert werden konnte, schien ein zusätzlicher GPC-Schritt nur bedingt notwendig zu sein. Die erhöhte Reinheit entsprach einer Steigerung von ca. 95 auf ca. 98 %, ging dabei aber gleichzeitig mit einem Verlust an Proteinmenge einher. In dieser hier gezeigten Reinigung entsprach die Proteinmenge des SP-Pools ca. 48 mg und lag damit deutlich über den ca. 35 mg Protein nach GPC. Zur Nutzung der saNirS als Antigen war diese zusätzliche Reinheitssteigerung durchaus sinnvoll. Soll die saNirS allerdings zukünftig in z. B. Interaktionsexperimenten eingesetzt werden, so kann auf die GPC verzichtet werden.

Das gereinigte Protein wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Dabei erwies es sich als sehr stabil. Nach zwei Jahren enthielt die Proteinlösung noch ca. 75 % stabiles Protein bei 60'000 relativer Molekularmasse auf einem hier nicht gezeigten SDS-PA-Gel. Zusammen mit dem in 3.4.2.2 beobachteten Verhalten einer Häm c-freien NirS bei Produktion in *E. coli*, die zu unlöslichem Protein führte, könnte die hier beschriebene Stabilität darauf hindeuten, dass die c-Typ Cytochrom-Variante der NirS den Vorläufer der hNirS darstellt, bzw. der Einbau von Häm  $d_1$  erst nach dem Einbau von Häm c erfolgt. Eine analytische Gelpermeationschromatographie (2.7.7.4) zeigte darüber hinaus, dass saNirS als Homodimer vorlag, was im Einklang mit den von Silvestrini *et al.* (1992) gezeigten Daten zur rekombinanten saNirS nach Produktion in *Pseudomonas putida* steht.

Die hier gereinigte saNirS wurde zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern und *in vitro*

Interaktionstests eingesetzt. Die Reinigung der saNirS nach Produktion in *P. stutzeri* unter aeroben Bedingungen (2.7.1.2) erfolgte analog zu der hier beschriebenen Reinigung aus *E. coli*.

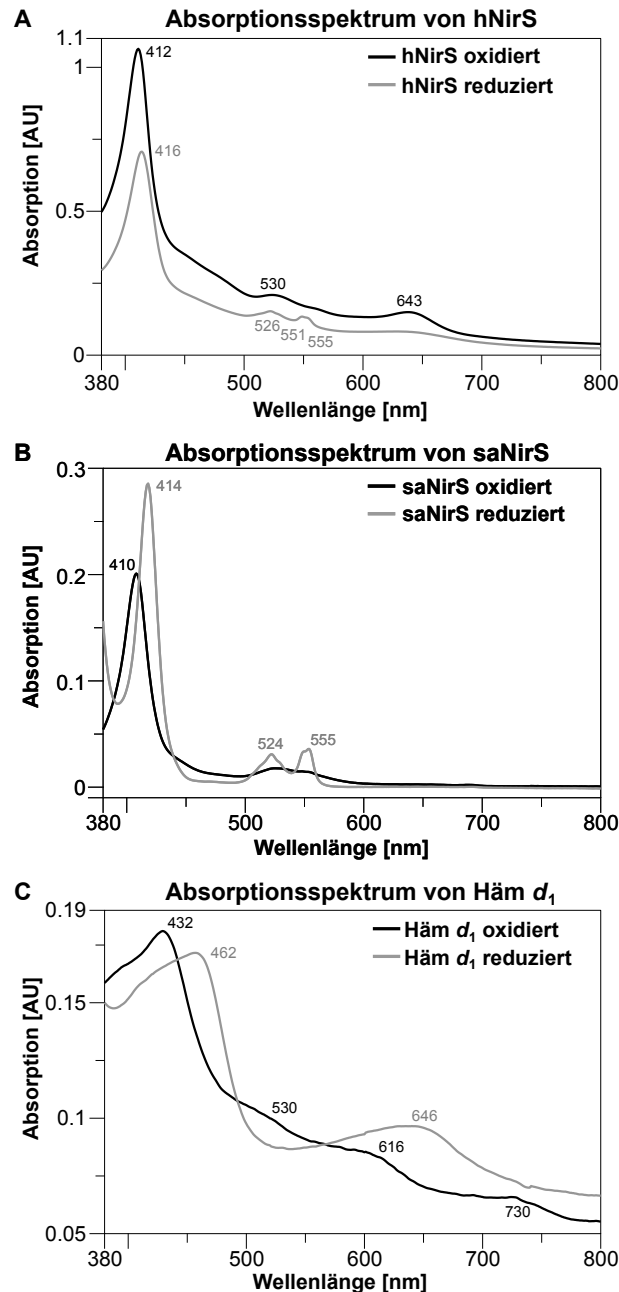
### 3.4.5 Häm $d_1$ -Extraktion

Die Extraktion von Häm  $d_1$  diente dazu, den Kofaktor aus der hNirS herauszulösen, um ihn für Bindungsexperimente und Kofaktortransferstudien nutzbar zu machen. Aus diesem Grund wurde die von Weeg-Aerssens *et al.* (1991) beschriebene Methode mit Hilfe von Tobias Schnitzer angepasst (Schnitzer, 2011). Die Extraktion wurde wie in 2.7.8 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden eine grüne Aceton-Phase und ein roter Proteinniederschlag erhalten. Diese beiden Proben, grüner Überstand und gelöster Proteinniederschlag, sowie das Ausgangsprotein (gereinigte hNirS - 3.4.3) wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie (2.8.6) untersucht. Die Messungen erfolgten sowohl in oxidiertem Form (durch Luftsauerstoff) als auch nach Zugabe von Reduktionsmittel (Natriumdithionit).

Abbildung 3.13 A zeigt die UV/Vis-Absorptionsspektren von gereinigter hNirS (3.4.3) in oxidiertem und reduziertem Form, um zu überprüfen, ob nach der Reinigung gebundenes Häm  $d_1$  vorlag. Dabei zeigten sich die Absorptionsmaxima des oxidierten Zustands bei 412 nm (Soret-Bande), 530 nm (Q-Banden) und 643 nm (Häm  $d_1$ -Absorption). Im reduzierten Zustand verschob sich die Soret-Bande zu 416 nm. Die Q-Banden zeigen im reduzierten Zustand eine deutlichere Aufspaltung in eine  $\beta$ -Bande bei 526 nm und ein  $\alpha$ -Banden-Duplett bei 551 und 555 nm. Das Absorptionsmaximum von proteingebundenem Häm  $d_1$  (ca. 640 nm, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991) fiel nur schwach aus.

Das Cytochrom  $cd_1$ -Spektrum ist in der Literatur hinreichend beschrieben und wich im oxidierten Zustand nur geringfügig von dem hier gemessenen Spektrum ab. Dieses lässt sich durch Einflüsse der verschiedenen, in der Literatur verwendeten Puffersysteme erklären. Die Abweichung der reduzierten Spektren war deutlicher und dabei zusätzlich vom gewählten Reduktionsmittel abhängig (Natriumdithionit, Hexacyanoferrat oder Ascorbat). Dennoch zeigte das hier aufgenommene Spektrum hohe Ähnlichkeit zu den in der Literatur beschriebenen Spektren (vergleiche Barber *et al.*, 1976, Hill & Wharton, 1978, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991, Silvestrini *et al.*, 1992 und Suzuki *et al.*, 2006). Der größte Unterschied lag in der schwachen Schulter bei ca. 460 nm und dem schwachen Maximum bei ca. 640 nm im reduzierten Zustand, die aufgrund zu niedriger Probenkonzentration nicht deutlich hervortraten. Es zeigt sich insgesamt deutlich, dass die in 3.4.3 gereinigte hNirS den Häm  $d_1$ -Kofaktor enthielt.

Nach der Extraktion blieb ein rotes Proteinsediment zurück. Dies wurde, wie in 2.7.8 beschrie-



**Abbildung 3.13: UV/Vis-Absorptionsspektren von gereinigter hNirS, saNirS nach Extraktion von Häm d<sub>1</sub> und extrahiertem Häm d<sub>1</sub>.** Die Proben wurden wie in Kapitel 2.7.8 beschrieben hergestellt. Die Messung des Absorptionsspektrums erfolgte im Bereich von 380-800 nm. Die schwarze Linie zeigt das Spektrum der oxidierten Proben. Die graue Linie stellt das Spektrum der reduzierten Proben (durch Zugabe von Natriumdithionit) dar. Spektren A zeigen dabei die Proben von hNirS, die in 25 mM Phosphatpuffer, 0.2 M NaCl, pH 6.4 vorlagen. Spektren B zeigen die Proben von saNirS die durch Aceton/HCl-Extraktion des Kofaktors erhalten wurden. Dabei lagen die Proben in 25 mM Phosphatpuffer, 6 M Urea, pH 7 vor. Spektren C zeigen das Absorptionsverhalten von extrahiertem Häm d<sub>1</sub>, das in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 7.3 vorlag. (Schnitzer, 2011).

ben, gelöst und die in Abbildung 3.13 B dargestellten UV/Vis-Absorptionsspektren aufgenommen. Durch Reduktion zeigte sich eine schwache Verschiebung der Soret-Bande von 410 nm

(oxidiert) zu 414 nm (reduziert). Die Q-Banden in Abb. 3.13 B bei 524 nm und 555 nm zeigen eine nahezu gleiche Lage wie die in Abb. 3.13 A dargestellten Maxima. Diese geringen Unterschiede waren auf die unterschiedlichen Puffersysteme, die fehlende Häm  $d_1$ -Absorption und den denaturierten Zustand durch Urea zurückzuführen. Die Merkmale des gebundenen Häm  $d_1$  bei ca. 460 nm in der reduzierten und 640 nm in der oxidierten und reduzierten Form fehlten hier (Abb. 3.13 B) ganz (vergleiche Barber *et al.*, 1976, Hill & Wharton, 1978, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991, Silvestrini *et al.*, 1992 und Suzuki *et al.*, 2006). Es war deutlich zu erkennen, dass es sich lediglich um die Cytochrom *c*-Form der Nitritreduktase handelte. Daraus ließ sich schließen, dass die Extraktion von Häm  $d_1$  quantitativ erfolgte und kein Häm  $d_1$  mehr in NirS gebunden blieb.

Die Aceton-Phase enthielt das extrahierte Häm  $d_1$  und zeigte dabei eine grünliche Farbe. Die organische Phase wurde wie in 2.7.8 beschrieben abgedampft und der wässrige Rückstand mit NaOH auf pH 7.3 eingestellt. Die wässrige Probe wurde daraufhin mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Dabei wurden die in Abb. 3.13 C gezeigten Absorptionsspektren erhalten. Das durch Reduktion mit Natriumdithionit erhaltene Absorptionsspektrum wies die zwei charakteristischen Merkmale (Maxima bei 462 nm und 646 nm) von Häm  $d_1$  auf, die mit Literaturwerten vergleichbar waren (Weeg-Aerssens *et al.*, 1991). Das Spektrum der oxidierten Lösung von Häm  $d_1$  zeigte die Soret-Bande bei 432 nm und schwache lokale Maxima bei 530, 616 und 730 nm. Damit waren auch diese Spektren mit der Literatur in Einklang zu bringen (Weeg-Aerssens *et al.*, 1991). Die aufgetretenen geringen Verschiebungen zwischen diesen Spektren und Literaturmessungen lassen sich durch die geringfügigen Unterschiede in der Extraktionsmethode erklären. Da die Aceton/HCl-Phase nach Eindampfen neutralisiert wurde, konnte es hier leicht zu Abweichungen im pH-Wert kommen, da eine pH-Wert-Anpassung mit solch kleinen Volumina (< 1 mL) ungenau war. Die in Abb. 3.13 C gezeigten Spektren belegen, dass die Extraktion des Häm  $d_1$ -Kofaktors erfolgreich war und damit zur zukünftigen Gewinnung des intakten Kofaktors genutzt werden kann. Die daraus resultierenden Einsatzgebiete, wie z. B. Kofaktorbindungs- und -transferstudien, werden zukünftig von Julia Adamczack in dieser Arbeitsgruppe weiter bearbeitet.

### 3.5 Proteinpräparation von NirN

Das *c*-Typ Cytochrom NirN stellt, wie in 1.4.5 beschrieben, ein potentiell Häm  $d_1$ -Insertionsprotein dar. Um die Eigenschaften der NirN bezüglich Kofaktorbindung, Kofaktortransfer

und Interaktion mit NirS genauer zu untersuchen, war es zunächst nötig NirN zu produzieren und zu reinigen. Dadurch sollte die NirN zu Kristallisationsexperimenten, zur Erzeugung von Antikörpern und *in vitro* Interaktionstests zur Verfügung stehen. Hierzu wurden verschiedene Möglichkeiten genutzt die NirN in ihrer nativen Form sowie als Fusionsprotein mit einem Tag zu reinigen.

### 3.5.1 Konstrukte für die NirN-Präparation

Zunächst wurde das Plasmid pET22b*nirN* von Münch (2009) genutzt, um NirN rekombinant in *E. coli* zu produzieren und als natives Protein zu reinigen. Des Weiteren wurde der Vektor pET22bStrepII*nirN* erzeugt (2.5), um ein Protein zu produzieren, das über einen N-terminalen StrepII-Tag verfügte. Somit sollte eine einstufige Reinigung ermöglicht werden, um effizient große Proteinmengen zur Kristallisation zu erhalten. Beide Konstrukte verfügten über eine PelB-Signalsequenz, die den periplasmatischen Export gewährleistete. Die für den StrepII-Tag kodierende Sequenz war darüber hinaus zwischen *pelB* und *nirN* lokalisiert.

### 3.5.2 Produktion von NirN

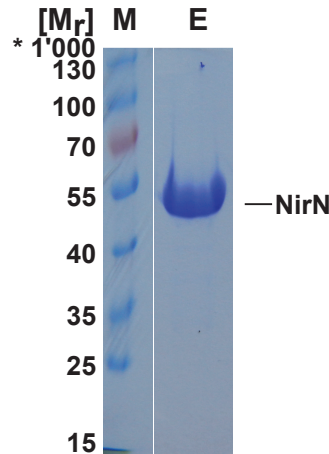
Die Produktion der NirN (nativ und als Fusionsprotein) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 durchgeführt (2.7.1.3). Der Vektor pEC86 (Arslan *et al.*, 1998) diente dabei zur Produktion des Ccm I-Systems in *E. coli* unter aeroben Bedingungen. Da die entsprechenden Vorteile in 3.4.2.2 ausführlicher dargestellt wurden, wird hier auf die Schilderung der Kultivierungsoptimierung verzichtet.

Die Kultivierung erfolgte zumeist im Maßstab von 6 L-Kulturen. Die erfolgreiche NirN Produktion konnte direkt bei Zellernte (2.7.2) anhand eines hellroten Zellpellets erkannt werden. Danach wurden die Zellen zur Reinigung durch Affinitätschromatographie mittels periplasmatischen Aufschlusses (2.7.3) extrahiert, während Zellen mit nativem rekombinantem NirN mittels French Press aufgeschlossen wurden (2.7.4). Der periplasmatische Extrakt konnte nach Zentrifugation direkt zur Affinitätschromatographie (2.7.7.5) eingesetzt werden, während der Kompletzellextrakt zunächst einer Dialyse gegen Puffer A unterzogen wurde (2.7.7.1).

### 3.5.3 Strep-Tag-Affinitätschromatographie der NirN

Die affinitätschromatographische Reinigung von StrepIINirN wurde, wie in 2.7.7.5 beschrieben, durchgeführt. Ein Reinigungserfolg konnte bereits während der Methode optisch

verfolgt werden, da das Fusionsprotein die Säule intensiv rot färbte. Die Reinigung der StrepII-NirN verlief vergleichbar zur Reinigung von NirF<sub>D.s.</sub>. Aus diesem Grund wird lediglich auf das erhaltene gereinigte Zielprotein eingegangen. Die Abbildung 3.14 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse einer Probe der vereinigten Elutionsfraktionen der StrepIINirN-Reinigung. Dabei wurden die Proben, wie in 2.8.2 beschrieben, behandelt.



**Abbildung 3.14: SDS-PAGE-Analyse der Affinitätschromatographie von StrepIINirN nach Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86.** Die Abbildung zeigt ein 12%iges Trenngel nach Färbung. Das Zielprotein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bStrepIInirN wie in 2.7.1.3 beschrieben produziert. Die SDS-PAGE wurde wie in 2.8.2 dargestellt durchgeführt. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [ $M_r$ ] sind angegeben (\* 1'000). **Spur E:** Pool der Elutionsfraktionen der StrepIINirN-Reinigung. Das Gelbild zeigt ein hochreines Fusionsprotein bei ca. 54'000. Dies setzt sich zusammen aus NirN (ca. 52'000) und dem fusionierten Tag (ca. 2'000).

Die in Abbildung 3.14 dargestellte SDS-PAGE-Analyse belegte den Erfolg der StrepIINirN-Reinigung. Hierbei zeigte die vereingte Elutionsfraktion eine deutliche StrepIINirN-Bande ohne weitere sichtbare Verunreinigungen. Die erhaltene Proteinlösung konnte anschließend auf eine Konzentration von 15 mg/mL NirN eingengt werden. Die Gesamtausbeute lag bei ca. 52.5 mg hochreinem Protein.

An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass C-terminal-getaggte NirN-Fusionsproteine nach Reinigung eine Verunreinigung aufwiesen. Diese besaß eine geringfügig kleinere relative Molekularmasse (ca. 3'000 bis 5'000 kleiner im SDS-PA-Gel) und war auf einen Verdau des N-Terminus der NirN zurückzuführen, der sich bereits während der Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 ereignete. Zwar konnte die Verunreinigung nach Affinitätschromatographie mittels präparativer GPC verringert werden, führte aber dennoch zu Verlusten in der Gesamtausbeute von NirN.

Bei der hier dargestellten N-terminal-getagkten NirN-Variante kam es zwar auch zu diesem

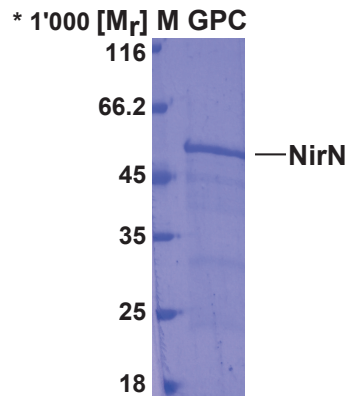
Verdau, jedoch wurde das verkürzte Nebenprodukt durch Verlust des StrepII-Tags nicht koreinigt, wodurch auf weitere Reinigungsschritte verzichtet werden konnte. Das so erzeugte N-terminal getaggte Fusionsprotein konnte direkt in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden.

### 3.5.4 Reinigung von NirN in nativer Form

Die Reinigung von rekombinant produzierter, nativer NirN diente dazu, ungetaggtetes Protein als Antigen zur Generierung von NirN-Antikörpern zu nutzen. Die Produktion von NirN in *E. coli* BL21 (DE3) mit pEC86 und pET22bnirN erfolgte analog zu der in 2.4.2 beschriebenen Bedingung. Die Reinigung von NirN wurde, analog der in 2.7.7 beschriebenen Schritte, mittels Anionenaustauscherchromatographie, Kationenaustauscherchromatographie und Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Da dies zum Zeitpunkt der Methodenoptimierung erfolgte, wurde die Reinigung im kleineren Maßstab durchgeführt. Lineare und Stufengradienten wurden mit den gleichen Pufferkonzentrationen betrieben, jedoch mit weniger steilem Anstieg durchgeführt. Am grundlegenden Prinzip der Reinigung änderte dies allerdings nichts und die Schritte waren sehr gut mit der Reinigung der saNirS (3.4.4) nach rekombinanter Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) mit pEC86 und pET22bnirS vergleichbar. Wie in der beschriebenen saNirS-Reinigung konnte der Verlauf der Chromatographien auch hier anhand der Wellenlängen 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 410 nm (Soret-Bande Häm c) dokumentiert werden. Nach den jeweiligen Reinigungsschritten wurden die gesammelten Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE-Analyse untersucht. Zielprotein enthaltende Fraktionen, die im SDS-PA-Gel eine Bande bei ca. 52'000 zeigten sowie eine rote Farbe besaßen, wurden zu Q-, SP- und GPC-Pools vereinigt und gegebenenfalls den notwendigen Dialysen (2.7.7.1) unterzogen. Die in Abb. 3.15 gezeigte SDS-PAGE-Analyse diente zur Reinheitskontrolle des finalen GPC-Pools der NirN-Reinigung.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte deutlich, dass die native NirN als ein sehr reines Protein erhalten werden konnte. Die Gesamtausbeute lag mit ca. 2.3 mg/L eingesetztem Kulturmedium bei ca. 4.6 mg. Somit war das Protein in ausreichender Menge vorhanden und sauber genug, um zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt zu werden.



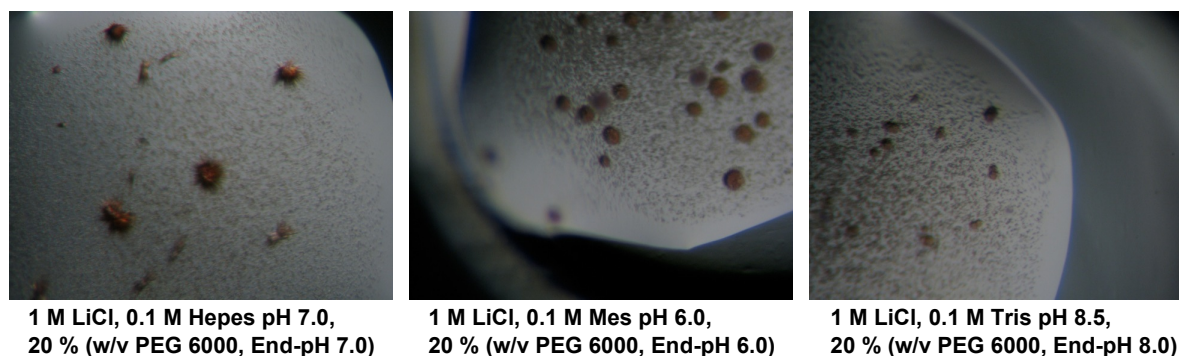


**Abbildung 3.15: SDS-PAGE-Analyse des GPC-Pools der NirN nach Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pET22bnirN und dreistufigem Reinigungsprotokoll.** Die Methoden wurden ähnlich zu den in Kapitel 2.7.7 dargestellten Abläufen durchgeführt. Die SDS-PAGE-Analyse (Trenngel 12 %, Coomassie-Färbung) zeigt den Proteingehalt der vereinigten Fraktionen nach präparativer GPC des rekombinanten, nativen Proteins NirN. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur GPC:** Probe des GPC-Pools der NirN-Reinigung. NirN ist durch entsprechende Beschriftung angezeigt.

### 3.5.5 Proteinkristallisation von NirN

Das Protein NirN wirft viele Fragen bezüglich seiner *in vivo*-Rolle in *P. aeruginosa* sowie anderen denitrifizierenden Bakterien auf. Eine aufgeklärte NirN-Struktur wäre vorteilhaft, um aus der Struktur auf mögliche Funktionen schließen zu können. Aus diesem Grund sollte die gereinigte StrepIINirN kristallisiert werden. Dazu wurde StrepIINirN in Endkonzentrationen von 5 mg/mL und 7.5 mg/mL eingesetzt und mit den in 2.9 genannten Screens in 1'152 Bedingungen getestet. Dabei zeigten vier Bedingungen ein Mikrokristallwachstum, jedoch wurden nach drei Wochen Wachstumszeit nur die in Abb. 3.16 gezeigten, clusterartige Nadeln erhalten. Die Bedingungen (Abb. 3.16) zeigten ähnliche Zusammensetzungen und sollten daher verfeinert werden. Dazu wurden Random-Screens genutzt, die die verschiedenen Pufferbedingungen zufällig variierten. Hierbei kamen Proteinkonzentrationen von 2.5 mg/mL, 5 mg/mL und 7.5 mg/mL zum Einsatz, jedoch blieben die Verfeinerungsversuche ohne Erfolg und es konnten keine Kristalle erhalten werden.

Das in Abb. 3.2 A gezeigte Strukturmodell der NirN lässt vermuten, dass das Protein möglicherweise eine flexible Linkerregion zwischen der Häm c- und Häm  $d_1$ -bindenden Domäne besitzt. Diese Linkerregion sorgt möglicherweise für eine zu hohe Dynamik im Protein, um Einkristalle zu erhalten. Die Kristallisationsexperimente sollten mit gebundenem Häm  $d_1$  wiederholt werden, da dies für eine Verringerung der Flexibilität des Proteins sorgen könnte. Eine alternative Herangehensweise wäre es, verkürzte Proteinvarianten, z. B. ohne Häm c-Domäne



**Abbildung 3.16: Kristalline StrepIINirN von *P. aeruginosa*.** Das Protein wurde wie in 2.7.7.5 und 2.9 gereinigt und kristallisiert. Die Bilder zeigen drei verschiedene Bedingungen, die kristalline NirN enthalten. Eine Verfeinerung der Bedingungen brachte keine reproduzierbaren Kristalle hervor.

und Linkerregion, oder mit Mutationen in der Linkerregion, die zu einer starrereren Struktur führen, zu nutzen. Diese Experimente zur Kristallisation von NirN werden von Julia Adamczack in dieser Arbeitsgruppe weitergeführt.

## 3.6 Erzeugung von Antikörpern

Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, Antikörper gegen NirN und NirS zu erzeugen, um diese in Western-Blot-Analysen (2.8.3) und Interaktionsstudien (2.11) einzusetzen.

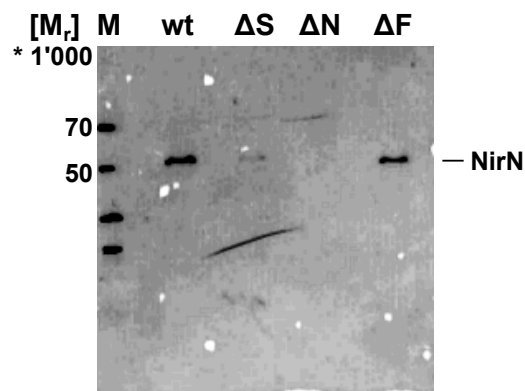
### 3.6.1 Monoklonale Antikörper

Für die Erzeugung monoklonaler Antikörper wurden die Antigene (NirN bzw. saNirS) zunächst wie in 3.4 und 3.5 beschrieben gereinigt. Anschließend wurden von Sabine Buchmeier Mäuse der BALP/c-Linie mit den gereinigten und steril filtrierten Antigenen immunisiert. Die durchgeführten Techniken richteten sich dabei nach Standardprotokollen (2.10.2).

Nachdem einzelne Hybridomazellen erhalten wurden, wurden die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf Antikörper gegen NirS bzw. NirN überprüft. Hierzu wurden gereinigte Antigene an die Oberfläche von ELISA-Platten gekoppelt und daran gebundene Antikörper mithilfe von sekundärem polyvalentem Anti-Maus-Antikörper-AP-Konjugat detektiert. Positive Klone wurden zur Untersuchung kultiviert und in anschließenden Western-Blot-Analysen gegen Zellextrakte von verschiedenen *P. aeruginosa* PAO1-Stämmen (wt,  $\Delta nirS$ ,  $\Delta nirN$  und  $\Delta nirF$ ) sowie Antigen produzierende *E. coli*-Stämme (2.2.2) getestet. Wie bereits in 3.1.2 beschrieben zeigen die Proteine NirS, NirN und NirF aus *P. aeruginosa* eine ca. 20-30%ige Aminosäurese-

quenzidentität. Daher waren diese Tests nötig, um hochspezifische monoklonale Antikörper, die keine Kreuzreaktionen zeigten, zu erhalten.

Am Beispiel des monoklonalen NirN-Antikörpers 2C11 soll die Selektivität der produzierten Antikörper demonstriert werden. Hierbei ist eine Western-Blot-Analyse zu sehen (Abb. 3.17), die mittels Anti-Maus-Antikörper in Konjugation mit Meerrettich-Peroxidase entwickelt wurde. Die Detektion erfolgte auf einem durch Chemolumineszenz belichteten Fotofilm. Die Proben stellten Proteinextrakte aus den folgenden *P. aeruginosa*-Stämmen dar: wt,  $\Delta nirS$ ,  $\Delta nirN$  und  $\Delta nirF$ . Alle Stämme wurden wie in 2.4.2 beschrieben für 7 h kultiviert. Die Präparation der Proben, die SDS-PAGE und der anschließende Blotvorgang erfolgten wie in 2.8.2 und 2.8.3 beschrieben. Die Detektion wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (pers. Mitteilung S. Buchmeier, 2010). Ein digitales Bild des entwickelten Films ist in Abb. 3.17 dargestellt.



**Abbildung 3.17: Western-Blot-Analyse von *P. aeruginosa* PAO1-Extrakten zum Test des monoklonalen NirN-Antikörpers 2C11.** Die Abbildung zeigt einen durch Chemolumineszenz entwickelten Fotofilm. Dieser wurde zur Entwicklung auf eine Western-Blot-Analyse aufgelegt, die Proben verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme enthielt. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben erzeugt. Die Analyse diente dazu, die Selektivität des eingesetzten primären  $\alpha$ NirN 2C11 zu testen. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur wt:** Proteinextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 wt. **Spur  $\Delta S$ :** Proteinextrakt von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirS$ . **Spur  $\Delta N$ :** Proteinextrakt von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$ . **Spur  $\Delta F$ :** Proteinextrakt von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$ . Die Bande der NirN ist markiert. (pers. Mitteilung S. Buchmeier, 2010).

Die Abbildung 3.17 zeigt Banden auf Höhe von ca. 52'000, welche der relativen Molekulargröße von NirN entsprachen. Die Banden waren in allen Spuren, außer der Spur  $\Delta N$  zu erkennen. Letztere diente als Negativkontrolle, da hier das Antigen nicht produziert wurde. Die NirN-Bande in der  $\Delta S$ -Spur war nur schwach zu erkennen. Wahrscheinlich lag der Grund hierfür in einer zu geringen Proteinmenge, trotz OD<sub>578</sub>-bereinigter Auftragung, auf dem Blot. In der Spur der wt-Probe war klar zu erkennen, dass dieser Antikörper keinerlei Wechselwirkung zu anderen Proteinen der Probe aufwies. Dies verdeutlicht die hohe Qualität der

monoklonalen Antikörper, die während dieser Arbeit entstanden sind.

Tabelle 3.3 zeigt eine Auflistung der erzeugten monoklonalen Antikörper (mAK) gegen NirS ( $\alpha$ NirS) und NirN ( $\alpha$ NirN). Die Nomenklatur der Antikörper richtete sich dabei nach den klonierten Hybridomazellen. Außerdem sind die Klassen und Subklassen der Antikörper aufgeführt, was für die Detektion mittels sekundären Antikörpern und die Bindung der Antikörper an Protein A- bzw. Protein G-Agarose-Säulen wichtig war.

**Tabelle 3.3: Generierte monoklonale Antikörper**

Antikörper	Antigen	Klasse und Subklasse
4A9	NirS	IgG <sub>1</sub>
2B8	NirS	IgG <sub>1</sub>
6C5	NirS	IgG <sub>2A</sub>
6E4	NirS	IgG <sub>1</sub>
3G9	NirS	IgG <sub>2A</sub>
2D6	NirS	IgG <sub>2A</sub>
3F10	NirS	IgG <sub>2A</sub>
1G12	NirS	IgG <sub>1</sub>
1B12	NirS	IgG <sub>2A</sub>
1A11	NirS	IgG <sub>1</sub>
2C11	NirN	IgM
1E11	NirN	IgM

Bei der Immunisierung zeigte sich, dass NirS ein deutlich besseres Antigen darstellte als NirN und deutlich mehr Antikörper gegen NirS produziert wurden. Die erhaltenen  $\alpha$ NirS konnten zur Detektion in Western-Blot-Analysen (2.8.3), Immunopräzipitationen (2.11.1) und Immunoaffinitätschromatographien (2.11.3) eingesetzt werden.

Die erhaltenen  $\alpha$ NirN konnten zwar sehr gut zur Detektion in Western-Blot-Analysen (2.8.3) eingesetzt werden, jedoch waren sie aufgrund der pentameren Struktur der IgM-Klasse nur schlecht für Immunopräzipitation und Immunoaffinitätsreinigungen geeignet. Der  $\alpha$ NirN 2C11 konnte zwar erfolgreich mittels Protein L-Agarose Säulenmaterial angereichert werden (2.10), dennoch war dieser Antikörper nachweislich nicht für Immunopräzipitationen geeignet, da er einen breiten Schmier auf entwickelten Western-Blot-Analysen erzeugte und dadurch eine Auswertung unmöglich machte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden zusätzlich polyklonale Antikörper gegen NirN und NirS erzeugt.

### 3.6.2 Polyklonale Antikörper

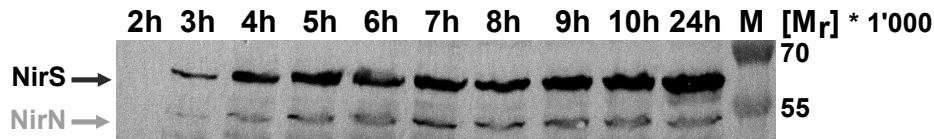
Die Erzeugung polyklonaler Antikörper (pAK) sowie deren Reinigung mittels einer Antigen-beschichteten Chromatographiesäule wurde von der Firma Metabion wie in 2.10.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde gegen das Antigen gereinigt, um eine möglichst hohe Selektivität der polyklonalen Antikörper zu erreichen. Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte dabei mit gereinigten, steril filtrierten Antigenen (NirS - 3.4 und NirN - 3.5).

Die entsprechenden ELISA-Daten zu den erhaltenen Antikörpern sind in Anhang 3 zu finden. Die pAKs gegen NirN wurden in Immunopräzipitationen (2.11.1) und Immunoaffinitätschromatographien (2.11.3) genutzt. Die pAKs gegen NirS kamen nur in der Immunopräzipitation (2.11.1) zum Einsatz.

## 3.7 Detektion von NirS und NirN in *P. aeruginosa* zu verschiedenen Wachstumszeitpunkten

Um einen Zusammenhang zwischen den Proteinen NirS und NirN herstellen zu können und um die Rolle von NirN genauer zu charakterisieren, musste zunächst untersucht werden, ob beide Proteine zeitgleich miteinander in *P. aeruginosa* präsent sind und ob es gegebenenfalls Abweichungen innerhalb verschiedener Wachstumsphasen gibt. Dafür wurde ein *P. aeruginosa* PAO1 wt mit pUCP20T für 24 h wie in 2.4.2 dargestellt unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Über einen Zeitraum von 2-10 h wurden der Bakterienkultur jeweils stündlich sowie einmalig nach 24 h Proben steril entnommen. Diese wurden wie in 2.8.2 und 2.8.3 beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die aufgetragenen Probenmengen wurden dabei der optischen Dichte bei 578 nm nach bereinigt. Der Blot wurde sowohl mittels  $\alpha$ NirS als auch mittels  $\alpha$ NirN und entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

Die Western-Blot-Analyse in Abb. 3.18 zeigte deutlich, dass *P. aeruginosa* PAO1 beide Proteine zeitgleich produzierte. Die Abb. 3.3 stellt das Wachstumsverhalten des wt-Stamms dar, welcher dem hier verwendeten Stamm entsprach. In der dort dargestellten lag-Phase bis ca. 5 h wurde die Konzentration von NirS in *P. aeruginosa*, wie in Abb. 3.18 zu sehen ist, gesteigert. Dies ging mit einer ebenfalls vermehrten Produktion von NirN einher. Während die Menge an NirS über den gesamten Wachstumsverlauf gesehen leicht zuzunehmen schien, blieb die produzierte Menge an NirN ab ca. 5 h konstant. Dies stand mit der Hypothese im Einklang, dass



**Abbildung 3.18: Western-Blot-Analyse von *P. aeruginosa* PAO1 wt pUCP20T-Extrakten.** Die Kultivierung erfolgte analog zu Kapitel 2.4.2. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und entsprechend 2.8.2 und 2.8.3 geblottet. Die Detektion der Zielproteine NirS und NirN erfolgte nacheinander mittels  $\alpha$ NirS und  $\alpha$ NirN. **Spuren 2-24 h:** Zeigen die Proben zum Zeitpunkt ihrer Entnahme aus der Kultur. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [ $M_r$ ] sind angegeben (\* 1'000). Die Zielproteine NirS und NirN sind mit Pfeilen hervorgehoben.

NirN möglicherweise nur an der Maturation der NirS beteiligt ist. Für diese Aufgabe müsste kein eins-zu-eins-Verhältnis zwischen den Proteinen vorliegen, da NirN lediglich katalytische Wirkung auf den Häm  $d_1$ -Einbau in die NirS hätte und somit zur Erhöhung der hNirS-Konzentration beitragen würde.

Es bleibt darüber hinaus festzuhalten, dass nach diesem Experiment und entsprechenden Vergleichen zu *P. aeruginosa*-Wachstumskurven (Abb. 3.3) der Wachstumszeitpunkt von 8 h unter anaeroben Bedingungen einen Zeitpunkt darstellte, in dem beide Zielproteine präsent waren. Die Kultur war außerdem noch nicht in der stationären Wachstumsphase angekommen, sondern befand sich noch am Ende der exponentiellen Phase. Sollte NirN tatsächlich an der NirS-Maturation beteiligt sein, so findet dieser Prozess wahrscheinlich ausgeprägter zum Zeitpunkt des Kulturwachstums als in der stationären Phase statt. Somit stellte eine 8 h-Kultivierung einen Kompromiss dar, zwischen einer möglichst dicht bewachsenen Kultur, die genügend Biomasse lieferte, sowie einer noch in der exponentiellen Phase befindlichen Kultur. Aus diesen Gründen wurde dieser Zeitpunkt als Kultivierungsdauer für *P. aeruginosa* gewählt, um Probenmaterial für *in vivo* Interaktionsexperimente zu produzieren. Diese *in vivo* Interaktionsexperimente umfassen Immunopräzipitationen, *Pull-down*-Analysen und Immunoaffinitätschromatographien die im Folgenden dargestellt werden.

### 3.8 Interaktionsexperimente mit NirS, NirN und NirF

Falls NirN tatsächlich an der Maturation von NirS beteiligt ist, würde dies eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen voraussetzen. Daher bestand eine Aufgabe dieser Arbeit darin, eine solche mögliche Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen.

### 3.8.1 *In vitro* Interaktionsexperimente

Zunächst wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die stabile Wechselwirkungen zwischen NirN und NirS *in vitro* voraussetzten. Nachdem die Proteine saNirS (3.4.4) und Strep-getaggte NirN (3.5.3) gereinigt zur Verfügung standen, wurden sie in Ko-Reinigungsversuchen eingesetzt. Dabei wurde das NirN-Fusionsprotein an eine Strep-Tactin-Affinitätssäule gebunden und anschließend saNirS-haltige Proteinlösung darüber gegeben. Nach dem Waschen der Säulenmatrix und anschließender Elution der NirN, wurde die Elutionsfraktion auf die Anwesenheit von saNirS hin untersucht. Dabei zeigte sich allerdings, dass die saNirS unter diesen Bedingungen keine Interaktion mit NirN einging, da nur NirN in der Elutionsfraktion detektiert wurde. Ein weiterer, alternativer *in vitro* Ansatz zum Nachweis von Interaktionen war die gemeinsame Gelpermeationschromatographie von saNirS und NirN. Dabei wurden die Proteine zunächst miteinander inkubiert, bis sie dann mittels analytischer GPC (2.7.7.4) auf eine mögliche Komplexbildung hin untersucht wurden. Auch diese Methode zeigte keine Interaktion unter den gewählten Bedingungen. Diese getesteten *in vitro* Interaktionsexperimente litten möglicherweise unter dem Fehlen des Häm  $d_1$ -Kofaktors oder weiterer nötiger Interaktionspartner, um einen stabilen Komplex zwischen NirS und NirN zu ermöglichen. Außerdem setzten beide Verfahren eine stabile Interaktion voraus. Möglicherweise handelt es sich aber bei den potentiellen Wechselwirkungen der beiden Proteine nur um schwache und transiente Interaktionen, für deren Nachweis die beiden verwendeten Methoden grundsätzlich ungeeignet sind.

Da die durchgeführten Ko-Reinigungen sowie Ko-Gelpermeationschromatographien der Proteine NirS und NirN keine Hinweise auf einen Komplex lieferten, wurden weitere Interaktionstests unter Zuhilfenahme der erzeugten Antikörper durchgeführt.

### 3.8.2 *In vivo* Interaktionsstudien mittels Immunopräzipitation

Während bei den Ko-Reinigungen und Ko-Gelpermeationschromatographien mit rekombinant produzierten und gereinigten Proteinen *in vitro* gearbeitet wurde, lag der Vorteil der Immunopräzipitation darin, dass hier direkt mit nativen Proteinen aus *P. aeruginosa* PAO1-Extrakten gearbeitet werden konnte. Darüber hinaus setzten die beiden erstgenannten Techniken starke Wechselwirkungen zwischen den zu untersuchenden Proteinen voraus. Da beide Techniken keinen Komplex erkennen ließen, wurde für die anschließenden Experimente unter der Annahme weiterverfahren, dass es sich bei einer Interaktion zwischen NirS und NirN

womöglich um eine schwache bzw. kurzlebige Interaktion handeln könnte. Diese Annahme führte dazu, dass die Interaktionsexperimente in Kombination mit *in vivo*-Protein-cross-linking (IVPCL) zur Interaktionsfixierung durchgeführt wurden. Aus diesem Grund wird zunächst auf die Optimierung des *cross-linking*-Protokolls für periplasmatische Proteine in *P. aeruginosa* eingegangen. Im Anschluss erfolgt die Auswertung der Immunopräzipitationsergebnisse.

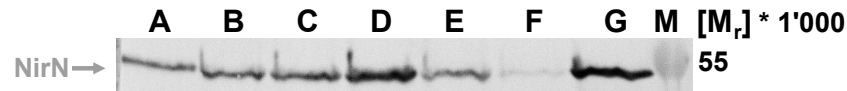
### 3.8.2.1 *In vivo* Protein-cross-linking

Die Technik des *in vivo* Protein-cross-linking diene dazu Protein-Protein-Interaktionen „einzufrieren“. Um eine Vernetzung von Proteinen *in vivo* zu erreichen, muss das Fixierungsreagenz die bakterielle Membran durchdringen können. Hierfür standen Agentien wie Formaldehyd und Glutaraldehyd als einfache Verbindungen oder komplexere Verbindungen wie Di(N-succinimidyl)glutarat zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde Formaldehyd (FA) eingesetzt, da es bakterielle Membranen sehr gut überwinden kann und einen kurzen Linker von ca. 2 Å darstellt. Dieser kurze Abstand sollte dafür sorgen, dass die Ergebnisse auf direkte Interaktionen zurückzuführen sind und nicht durch Vernetzung von Proteinen in naher Umgebung zustande kommen konnten. Des Weiteren stellt FA einen Vernetzer dar, bei dem die kovalente Verknüpfung durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer wieder aufgebrochen werden kann. Diese Reversibilität war wichtig für die SDS-PAGE-Analyse.

Die Durchführung von *in vivo* Protein-cross-linking unter Einsatz von Formaldehyd wurde schon häufig zur Fixierung von Protein-Protein-Interaktionen cytoplasmatischer Proteine eingesetzt. Dies schlug sich auch in der Literatur nieder. Hier wurde von eingesetzten Formaldehyd-Endkonzentrationen bis zu 2 % berichtet (Klockenbusch & Kast, 2010). Da es sich beim periplasmatischen Kompartiment aber um ein für das Vernetzungsreagenz leichter zu erreichendes Kompartiment als das Cytoplasma handelt, war davon auszugehen, dass die benötigte FA-Konzentration niedriger angesetzt werden konnte.

Zunächst erfolgte eine Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 für 8 h unter anaeroben Bedingungen (2.4.2 und 3.7). Im Anschluss wurde, wie in 2.7.9 beschrieben, IVPCL durchgeführt (verändert nach Vasilescu *et al.*, 2004). Dabei kamen FA-Konzentrationen von 0.125 % bis 1 % zum Einsatz. Zudem wurden verschiedene Reaktionszeiten von 10-60 min getestet. Nach Zellernte und Aufschluss schloss sich eine Immunopräzipitation von NirN (2.11.1) an. Die erhaltenen Proben wurden wie in 2.8.2 und 2.8.3 beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analyse nach Detektion von NirN sind in Abbildung 3.19 dargestellt.





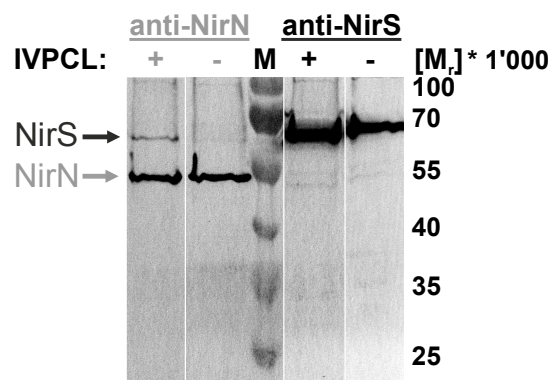
**Abbildung 3.19: Western-Blot-Analyse der Immunopräzipitation von NirN nach IVPCL unter verschiedenen Bedingungen.** Die Proben wurden wie in Kapitel 2.7.9 und 2.11.1 beschrieben hergestellt. Dabei wurden zunächst *P. aeruginosa* PAO1-Kulturen für 8 h unter anaeroben Bedingungen kultiviert, anschließend einem IVPCL unterzogen und für die Immunopräzipitation bearbeitet. Im Anschluss erfolgte eine Proteintrennung durch SDS-PAGE mit einem 12%igem Trenngel und anschließender Western-Blot-Analyse und Detektion auf NirN mit  $\alpha$ NirN. Die Proben der verschiedenen Spuren wurden unter verschiedenen IVPCL-Bedingungen vernetzt. Die Spuren setzten sich nach folgendem Schlüssel zusammen [FA-Konz. (v/v), Reaktionszeit]: **Spur A:** 1 % FA, 10 min; **Spur B:** 1 % FA, 20 min; **Spur C:** 0.5 % FA, 20 min; **Spur D:** 0.125 % FA, 20 min; **Spur E:** 1 % FA, 30 min; **Spur F:** 1 % FA, 60 min; **Spur G:** ohne IVPCL; **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). Die Zielproteinbande für NirN ist markiert.

Die Abb. 3.19 zeigt, dass die Mengen NirN, die immunopräzipitiert werden konnten, stark von den IVPCL-Bedingungen abhingen. Die größte Menge Protein war in Spur G zu sehen, die zugleich die Probe ohne IVPCL darstellte. Die nächstgrößere Proteinmenge war in Spur D (0.125 % FA, 20 min) vorhanden. Die detektierte NirN-Menge in den Spuren A, B und C lag dabei unter der NirN-Menge in Spur D. Spur E (1 % FA, 30 min) zeigte bereits zu starke Defizite in der präzipitierbaren Menge NirN. Spur F (1 % FA, 60 min) enthielt nahezu kein Zielprotein mehr. Bei dieser Probe war bereits während der Bearbeitung zu erkennen, dass IVPCL für 1 h mit 1 % FA eine zu harsche Bedingung darstellte, da es hier zur Präzipitation eines unlöslichen Proteinaggregats kam und der Extrakt keine rotbraune Farbe durch die Cytochrome mehr aufwies. Anhand dieses Ergebnisses wurden die Bedingungen aus Spur D, 20 min IVPCL mit 0.125 % FA, für die weiteren Interaktionsexperimente verwendet. Es bleibt festzuhalten, dass damit sehr schonende IVPCL-Bedingungen gewählt wurden.

### 3.8.2.2 Ko-Immunopräzipitation von NirN und NirS

Die Immunopräzipitation (IP) von NirS und NirN wurde analog zu 2.11.1 und 3.8.2.1 durchgeführt. Hierbei wurde zunächst überprüft, ob es zu einer jeweiligen Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) kam. Dazu wurden die Western-Blot-Analysen wie in 3.8.2.1 zusätzlich auf die Anwesenheit des ko-präzipitierten Proteins hin untersucht. Dies erfolgte entweder mit  $\alpha$ NirS oder  $\alpha$ NirN. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Die linke Seite der Abbildung 3.20 zeigt die Western-Blot-Analyse einer IP von NirN. Dabei wurden *P. aeruginosa* PAO1 wt-Extrakte mit (+) und ohne (-) IVPCL (nach Standardbedingungen - 2.7.9) mit pAKs gegen NirN inkubiert und die IP von NirN wie in 2.11.1 beschrieben



**Abbildung 3.20: Western-Blot-Analyse der Ko-Immunopräzipitation von NirS und NirN in Abhängigkeit von IVPCL.** Die Immunopräzipitation von NirN und NirS wurde, wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben, mit und ohne IVPCL (2.7.9) von *P. aeruginosa* PAO1 wt-Kulturen nach Wachstum für 8 h unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Detektion der Zielproteine erfolgte mittels  $\alpha$ NirN und  $\alpha$ NirS wie in 2.8.3 beschrieben. **Spur Anti-NirN +:** IP von NirN nach IVPCL. **Spur Anti-NirN -:** IP von NirN ohne IVPCL. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). **Spur Anti-NirS +:** IP von NirS nach IVPCL. **Spur Anti-NirS -:** IP von NirS ohne IVPCL. Die Banden für NirN und NirS sind durch Pfeile markiert.

durchgeführt. Anschließend wurden die Proben per Western-Blot-Analyse (2.8.3) auf das Vorhandensein von NirN und NirS ko-detektiert. Dabei ergab sich ein unterschiedliches Ergebnis in Abhängigkeit vom IVPCL. Ohne *in vivo* Vernetzung der Proteine mit FA war kein mit NirN ko-präzipitierende NirS zu detektieren. Dieses Ergebnis steht mit den oben beschriebenen Beobachtungen in Einklang, dass eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinen NirS und NirN schwach bzw. kurzlebig sein könnte. Die Durchführung der Ko-IP nach IVPCL führte zu einem anderen Ergebnis. Unter diesen Bedingungen war es möglich die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase NirS zusammen mit NirN zu ko-präzipitieren.

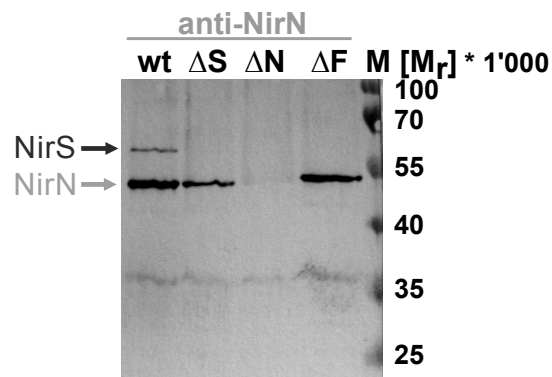
Dieser experimentelle Nachweis war zugleich der erste Beweis einer Interaktion zwischen NirN und NirS. Die Notwendigkeit des IVPCL wies zusätzlich noch auf die Art der Interaktion zwischen diesen Proteinen hin. Nur durch ein kovalentes Fixieren dieser Interaktion war es möglich beide Proteine zu detektieren. Somit sprach auch dieser Sachverhalt für eine sehr schwache oder aber kurzlebige Interaktion zwischen den Proteinen. Diese Beobachtungen passen zur Hypothese (1.4.5), dass NirN am Einbau des Kofaktors Häm *d*<sub>1</sub> in die NirS beteiligt sein könnte. Direkt nach dem Einbau des Kofaktors könnte es zur Dissoziation des Komplexes kommen.

Die IP von NirS sowohl unter Einsatz von monoklonalen (Daten nicht gezeigt) und polyklonalen Antikörpern zeigt das in Abb. 3.20 rechts dargestellte Bild. Es kam sowohl ohne (-) als auch mit (+) IVPCL nicht zu einer detektierbaren Menge an ko-präzipitiertem NirN nach IP

von NirS. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Mehrheit der NirS zum Zeitpunkt des Experiments in der holo-Form, also der Häm  $d_1$ -enthaltenden Form, vorlag und die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid katalysierte. In dieser Form ist eine Interaktion mit NirN nicht mehr nötig. Wahrscheinlich lag nur ein kleiner Teil von NirS in der hypothetischen semi-apo-Form vor, welche die Form der NirS darstellt, die mit NirN interagiert. Folglich konkurrierte diese Minderheit an saNirS-NirN-Komplex mit einer Mehrheit von hNirS um die NirS-Antikörper bei der Immunopräzipitation. Falls tatsächlich sehr geringe Mengen an NirN mit saNirS ko-präzipitiert wurden, so lag die Menge offensichtlich unter der Nachweisgrenze.

### 3.8.2.3 Ko-Immunopräzipitation von NirN und NirS in Abhängigkeit von NirF

Nachdem nun der erste Nachweis für eine NirS-NirN-Interaktion erbracht wurde, sollte dieses Ergebnis durch IP von NirN in verschiedenen *P. aeruginosa* PAO1-Mutanten validiert werden. Hierzu wurden zusätzlich zum wt die Stämme  $\Delta nirS$ ,  $\Delta nirN$  und  $\Delta nirF$  eingesetzt. Das IP-Experiment wurde analog zu den bereits beschriebenen Bedingungen (2.4.2, 2.7.9, 2.8.2, 2.8.3 und 2.11.1) durchgeführt. Die Abbildung 3.21 zeigt eine Western-Blot-Analyse einer Ko-IP von NirN aus FA-vernetzten Extrakten der verschiedenen *P. aeruginosa*-Mutanten nach Detektion von NirN und NirS.



**Abbildung 3.21: Western-Blot-Analyse der Ko-Immunopräzipitation von NirN nach IVPCL in verschiedenen *P. aeruginosa* PAO1-Mutanten.** Die Ko-IP von NirN wurde analog zu den in 2.7.9 und 2.11.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Extrakte verschiedener *P. aeruginosa* PAO1-Mutanten nach 8 h Wachstum unter anaeroben Bedingungen verwendet. Die Detektion der Zielproteine erfolgte nach Western-Blot-Analyse (2.8.3) mit  $\alpha$ NirS und  $\alpha$ NirN. **Spur wt:** Ko-IP von NirN in *P. aeruginosa* PAO1 wt nach IVPCL. **Spur  $\Delta S$ :** Ko-IP von NirN in *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirS$  nach IVPCL. **Spur  $\Delta N$ :** Ko-IP von NirN in *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$  nach IVPCL. **Spur  $\Delta F$ :** Ko-IP von NirN in *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  nach IVPCL. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). Die Zielproteine NirS und NirN sind mit Pfeilen markiert.

Die Abb. 3.21 zeigt in der wt-Spur den bereits beschriebenen Nachweis für die Interakti-

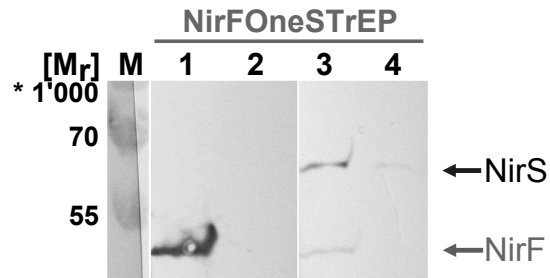
on zwischen NirN und NirS. Die Durchführung des IP-Experiments in der *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirS$ -Mutante zeigte erwartungsgemäß keine Ko-Präzipitation von NirS, aber das immuno-präzipitierte NirN. Aus dem Extrakt der *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$ -Mutante war wie erwartet keine IP von NirN möglich. Allerdings zeigte diese Probe klar, dass die Detektion von NirS im wt-Stamm nicht auf unspezifische Wechselwirkungen mit den NirN-Antikörpern oder dem Säulenmaterial zurückzuführen war, sondern durch die Interaktion mit NirN zustande kommen musste. Wie in Abb. 3.21 ganz rechts zu sehen ist, fand aus dem Extrakt der *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$ -Mutante zwar eine IP von NirN statt, dennoch war es nicht möglich NirS zu detektieren. Dies ließ die Vermutung zu, dass die Interaktion zwischen NirS und NirN abhängig von NirF ist. Dabei konnte NirF einerseits direkt für die Interaktion zwischen NirN und NirS wichtig sein und einen Komplex mit diesen eingehen. Andererseits bestand die Möglichkeit, dass die Häm  $d_1$ -Biosynthese vollständig ablaufen musste und eine Interaktion zwischen NirN und NirS nur möglich war, wenn der Kofaktor vorhanden war. Letzteres ist in der  $\Delta nirF$ -Mutante nicht der Fall (Kawasaki *et al.*, 1997).

Diese Experimente zeigten deutlich, dass eine Interaktion zwischen NirN und NirS stattfand, die sich allerdings nur in Anwesenheit von NirF ausbildete. Die Zusammenhänge zwischen NirN und NirS schienen also deutlich komplexer zu sein, als zunächst angenommen.

### 3.8.3 Pull-down-Analysen von NirF

Es konnte durch Ko-IP (3.9.1.3) gezeigt werden, dass NirF einen Einfluss auf die Interaktion zwischen NirN und NirS ausübt. Um dieses Ergebnis besser zu verstehen, sollte überprüft werden, ob es eine Protein-Protein-Interaktion zwischen NirF und den anderen beiden Proteinen gab. Aus diesem Grund wurden Pull-down-Analysen von NirF durchgeführt und auf Ko-Präzipitation von NirN und NirS hin überprüft. Dazu wurden zwei *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$ -Stämme verwendet. Einer davon enthielt das pUCP20TnirFOneSTrEP-Plasmid zur Komplementierung des  $\Delta nirF$ -Genotyps und Wiederherstellung der Häm  $d_1$ -Biosynthese (3.2.1). Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit dem Plasmid pUCP20T. Die Kultivierung erfolgte über 8 h unter anaeroben Bedingungen (2.4.2). Nachfolgend wurden IVPCL (2.7.9) und das in 2.11.2 geschilderte Strep-Protein Interaktions-Experiment (SPINE) durchgeführt. Die anschließende SDS-PAGE (2.8.2) und Western-Blot-Analyse (2.8.3) ließen eine Detektion von NirFOneSTrEP und NirS zu. Die dazugehörige Analyse ist in Abb. 3.22 dargestellt.

Wie aus Abb. 3.22 Spur 1 hervorgeht, kam es unter den gewählten Bedingungen zur Produktion des Fusionsproteins NirFOneSTrEP. Das Wachstum des komplementierten Stammes



**Abbildung 3.22: Western-Blot-Analyse eines NirFOneSTrEP Pull-down-Experiments mit *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  pUCP20TnirFOneSTrEP.** Strep-getaggte NirF wurde wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben durch Kultivierung für 8 h unter anaeroben Bedingungen von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  pUCP20TnirFOneSTrEP (Komplementation) produziert. Nach IVPCL (2.7.9) und SPINE (2.11.2) wurde eine Western-Blot-Analyse (2.8.3) zur Detektion von NirF und NirS durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mittels Strep-Tactin-AP-Konjugat und  $\alpha$ NirS. Als Kontrolle diente das gleiche Experiment mit Extrakt von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  pUCP20T. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur 1:** SPINE von Komplementation mit Detektion von NirFOneSTrEP. **Spur 2:** SPINE von Kontrolle mit Detektion von NirFOneSTrEP. **Spur 3:** SPINE von Komplementation mit Detektion von NirS. **Spur 4:** SPINE von Kontrolle mit Detektion von NirS. Die Proteine NirF und NirS sind durch Pfeile markiert.

konnte, wie in 3.2.1, partiell wiederhergestellt werden. Eine Präzipitation des Fusionsproteins mittels Strep-Tactin-Säulenmaterial war, wie in Spur 1 zu sehen, möglich. Ein Teil der gleichen Probe wurde auf einer weiteren Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von NirN und NirS hin untersucht. Während NirN nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), war NirS deutlich nachweisbar (Spur 3, Abb. 3.22). Der Vergleich zwischen den Proben aus der *nirF*-Komplementation (Spur 3) und der *nirF*-Deletionsmutante (Spur 4) zeigte, dass in der Deletion lediglich ein leichter Rückstand von NirS auf der Säulenmatrix verblieb, während eine deutlich größere Menge an NirS mit NirFOneSTrEP ko-gereinigt werden konnte. Dieses Experiment zeigte also, dass es eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NirS und NirF gab.

Wenngleich ein Nachweis von NirN unter diesen Bedingungen nicht möglich war, sollte eine Beteiligung von NirN bei der Interaktion von NirS und NirF nicht ausgeschlossen werden. Wie 3.8.2.3 zeigte, war die Interaktion zwischen NirN und NirS abhängig von der Anwesenheit der NirF. Eine direkte Interaktion zwischen NirF und NirN könnte diese Beobachtung erklären. Eine andere Interpretation wäre, dass NirF und NirN nicht direkt miteinander interagieren. Die Abhängigkeit der NirS-NirN-Interaktion könnte dadurch erklärt werden, dass eine NirS-NirF-Interaktion erst dazu führte, dass NirN mit NirS interagieren konnte, weil durch Kontakt zwischen NirF und NirS eine Konformationsänderung der NirS-Oberfläche ausgelöst wurde, die zur Ausbildung der Interaktionsfläche mit NirN führte. Alternativ könnte der C-terminale

OneSTrEP-Tag der NirF eine Ausbildung des Komplexes zwischen NirF und NirN verhindern. Dies würde erklären, warum der Wachstumsphänotyp der  $\Delta nirF$ -Mutante, im Vergleich zum wt, nur partiell wiederhergestellt werden konnte (Abb. 3.3). Zumindest stand Letzteres mit den in Abb. 3.3 gezeigten Ergebnissen in Einklang, in denen deutlich wurde, dass die native NirF ohne C-terminalen Tag in der Lage war den Wachstumsphänotyp vollständig zu komplementieren. Aus diesem Grund wurde auch eine N-terminal-getaggte Variante der NirF getestet. Die Modifikation des N-Terminus führte jedoch dazu, dass eine Komplementation nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund konnte ein SPINE mit diesem Konstrukt nicht durchgeführt werden.

Zusätzlich wurden mit dem *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  pUCP20TnirFOneSTrEP IVPCL und Immunopräzipitationen von NirS bzw. NirN durchgeführt, um zu überprüfen, ob NirFOneSTrEP in diesen Proben zu detektieren war. Die Experimente konnten zwar erfolgreich durchgeführt werden, dennoch ließen sich keine zuverlässigen Aussagen über eine Interaktion treffen, da es immer zu einer signifikanten Menge von NirFOneSTrEP in Kontrollexperimenten kam. Eine Erklärung hierfür wäre die Interaktion des Lipidankers der NirF mit den verwendeten Hilfsmitteln wie Säulenmaterial und Reaktionsgefäßen. Auch verlängerte Waschschrte oder Veränderungen der verwendeten Puffer brachten hier keine Erfolge. Aus diesen Gründen sind diese Daten hier nicht gezeigt.

Es bleibt festzuhalten, dass eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NirS und NirF nachgewiesen werden konnte. Zur Untersuchung, ob es auch eine direkte Interaktion zwischen NirN und NirF gab, waren andere Techniken nötig. Wie in 3.3 dargestellt wurde, besteht nun die Möglichkeit Antikörper gegen NirF zu produzieren. Zwar handelt es sich bei der gereinigten NirF um das *D. shibae*-Protein, dennoch besteht die Möglichkeit bei einer ca. 55%igen Aminosäuresequenzidentität zu NirF<sub>Pa.</sub>, dass NirF<sub>D.s.</sub>-Antikörper beide Proteine erkennen können. Solche Antikörper würden weitere Interaktionsexperimente wie die Ko-IP und Immunoaffinitätschromatographie ermöglichen, die mit nativer NirF durchführbar wären. Die Immunoaffinitätschromatographie könnte auch dafür geeignet sein einen vermeintlichen Kofaktor-Transporter zu identifizieren.

### 3.8.4 Immunoaffinitätschromatographie von NirS und NirN

Da die Interaktionsstudien mit Strep-getaggtm NirF die oben aufgezählten Probleme zeigten, sollte die Immunoaffinitätsreinigung (2.11.3) von NirS bzw. NirN dazu genutzt werden, größere Mengen an Protein-Komplexen anzureichern, um diese mittels Massenspektrometrie

(2.8.5) zu analysieren. Daraus sollte sich die Möglichkeit ergeben ein genaueres Bild von den Interaktionen der drei Proteine NirS, NirN und NirF zu erhalten. Der experimentelle Ablauf der Immunoaffinitätschromatographie war in drei wesentliche Abschnitte unterteilt, die im Folgenden kurz erläutert werden.

#### 3.8.4.1 Präparation der Säulenmaterialien

Die erste Aufgabe bestand darin, das Immunoaffinitätssäulenmaterial zu präparieren. Hierzu wurden die Antikörper an ein Gemisch aus Protein A und Protein G-Agarose gebunden. Im Anschluss wurden die Antikörper mittels Dimethylpimelimidat, einem 9.2 Å langen Linker, kovalent an die Säulenmatrix gebunden (2.11.3.1), dabei wurde eine Vernetzung an freien Aminogruppen herbeigeführt. Im Anschluss wurden Proben der  $\alpha$ NirS- und  $\alpha$ NirN-Säulenmaterialien auf ihre Bindefähigkeit zum jeweiligen Antigen überprüft (Daten nicht gezeigt). Sofern dies gewährleistet war, kamen die Säulenmaterialien in der Immunoaffinitätschromatographie zum Einsatz.

#### 3.8.4.2 Reinigungen der Antigene

Die Reinigung der Antigene wurde wie in 2.11.3.2 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden *P. aeruginosa* PAO1 wt-Extrakte nach Kultivierung (8 h, anaerob - 2.4.2) und IVPCL (2.7.9) eingesetzt. Die jeweiligen Kontrollen bestanden im Falle der NirS-Reinigung aus demselben experimentellen Ablauf unter Verwendung von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ nirS-Extrakt. Für die Kontrolle der NirN-Reinigung wurde *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ nirN genutzt. Nachdem das Säulenmaterial mit Extrakt beladen wurde und insgesamt 150 SV mit verschiedenen Puffern gewaschen wurde, wurden die Antigene samt vernetzter Interaktionspartner von der Säule in drei verschiedenen Schritten eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden neutralisiert, vereinigt und konzentriert. Im Anschluss wurden die Proben einer SDS-PAGE (2.8.2) unterzogen und mit SYPRO-Ruby (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt. Dabei wurde ein Vergleich zwischen den Bandenmustern der Immunoaffinitätsreinigung der Antigene aus den wt-Extrakten mit den erhaltenen Bandenmustern der Kontrollen verglichen (Anhang 4). Banden, die zusätzlich in den wt-Extraktproben auftraten, wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse durch Dr. Martin Kucklick und Undine Felgenträger vorbereitet (2.8.5).

Diese Methode war stark von der Qualität und Stabilität der Antikörper abhängig. Wie in 2.11.3.1 beschrieben wurde, kam für die NirS-Reinigung ein Mix aus monoklonalen Maus-Antikörpern gegen NirS zum Einsatz (Tabelle 3.3), während zur NirN-Reinigung auf polyklo-

nale Kaninchen-Antikörper zurückgegriffen werden musste. Trotz gleicher Mengen der Antikörper und gleicher Art der Verknüpfung mit dem Säulenmaterial, kam es bei den polyklonalen AKs zu einer stärkeren Ablösung der Antikörper vom Säulenmaterial als es bei den monoklonalen Antikörpern der Fall war.

Es war festzustellen, dass eine größere Menge an NirS als an NirN gereinigt werden konnte. Dies konnte mehrere Gründe haben, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen. Zunächst war wahrscheinlich, dass jeder Antikörper, der NirS gebunden hat, zu einer Reinigung des Dimeres von NirS führte (Nurizzo *et al.*, 1997). Dies war bei NirN nicht der Fall, da NirN keine Dimere bildete, sondern als Monomer vorlag (Münch, 2009). Folglich sollte die doppelte Menge an NirS in der SDS-PAGE-Analyse zu detektieren sein. Weiterhin war der Mix aus monoklonalen Antikörpern gegen NirS spezifischer und vor allem besaß er in der Gesamtheit eine stärkere Bindung an das Antigen, als es bei den hier verwendeten polyklonalen NirN-Antikörpern der Fall war. Es sei dabei auch nochmals erwähnt, dass die pAKs gegen NirN bereits einmal von einer Antigen-Säule im Zuge des Herstellungsverfahrens der polyklonalen Antikörper (2.10.1) eluiert wurden. Die Elution wurde ähnlich wie in der hier beschriebenen Methode (2.11.3.2 - Elutionspuffer-1) mit Glycin-Puffer bei niedrigem pH-Wert eingeleitet (Angaben Metabion). Daher sind diese Antikörper schon im Zuge der Herstellung (2.10.1) und der Anbindung der Antikörper an die Säulenmatrix (2.11.3.1) mehrfach harschen Bedingungen ausgesetzt worden, sodass dies negativen Einfluss auf die Bindungsstärke zum Antigen gehabt haben könnte.

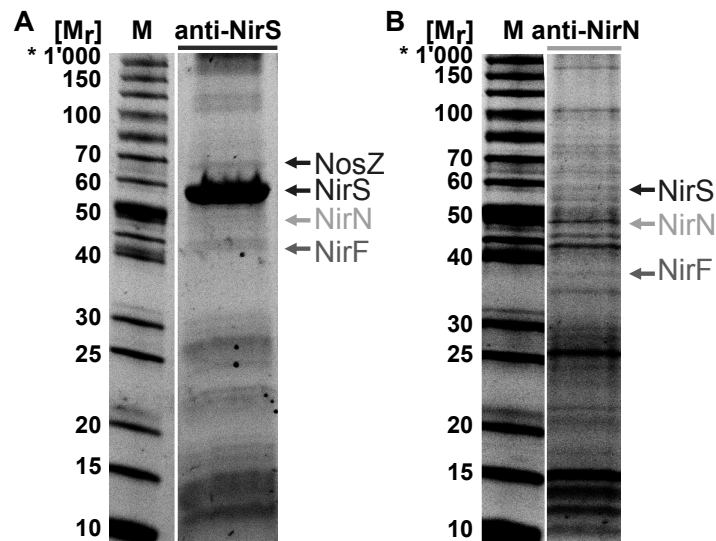
#### 3.8.4.3 Analyse der ko-gereinigten Interaktionspartner von NirN und NirS

Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte wie in (2.8.5) beschrieben. Die Abb. 3.23 zeigt die erhaltenen SDS-PA-Gele aus denen die Gelbanden zur weiteren Analyse herausgeschnitten wurden. Die identifizierten Proteine aus den Massendaten sind entsprechend in der Abb. 3.23 aufgezeigt. Die Datentabellen zu diesen gezeigten Proteinen sind im Anhang 5 aufgelistet.

Die aufgenommenen massenspektrometrischen Daten führten eindeutig zum Nachweis der in Abb. 3.23 gezeigten Proteine. Zunächst war in A deutlich zu erkennen, dass die Immunoaffinitätsreinigung von NirS erfolgreich ablief. Ebenso war die Reinigung von NirN erfolgreich (B), wenngleich sie wegen der beschriebenen Gründe weniger gut ausfiel. In beiden Fällen konnten zusätzliche Proteine identifiziert werden.

Die Anreicherung von NirS führte zu Nachweisen von NirN und NirF. Dies stand im Ein-





**Abbildung 3.23: SDS-PAGE-Analysen der Immunoaffinitätschromatographien von NirS und NirN aus *P. aeruginosa* PAO1 wt nach IVPCL.** Die Experimente wurden wie in den Kapiteln 2.4.2, 2.7.9, 2.11.3.1, 2.11.3.2 und 2.8.5 erklärt durchgeführt. Teil A zeigt die Immunoaffinitätschromatographie von NirS mittels einem Mix aus mAK gegen NirS. Der Teil B zeigt die Immunoaffinitätschromatographie von NirN mittels pAK gegen NirN. Die eluierten und vereinigten Proben wurden zu SDS-PAGE-Analyse vorbereitet (2.8.2) und in einem All-kDA Gel der Firma Bio-Rad getrennt. Die Färbung erfolgte mit SYPRO Ruby der Firma Invitrogen. Banden wurden ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung unterzogen (2.8.5). **Spuren M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen  $[M_r]$  sind angegeben (\* 1'000). **Spur Anti-NirS:** Immunoaffinitätschromatographie von nativer NirS nach IVPCL. **Spur Anti-NirN:** Immunoaffinitätschromatographie von nativer NirN nach IVPCL. Die detektierten Proteine sind durch Pfeile und Beschriftungen angezeigt.

klang der bisher in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse (3.8.2 und 3.8.3). Darüber hinaus konnten somit die beiden fehlenden Gegenrichtungen der Immunopräzipitation von NirN und *Pull-down*-Analysen von NirF gezeigt werden. Insbesondere diese beiden Experimente wurden durch die hier deutlich größere Menge an gereinigter NirS aufgewertet. Es konnte dadurch eine zu detektierende Menge an Protein-Protein-Interaktionspartner gezeigt werden, was zuvor durch Western-Blot-Analysen (2.8.3) nicht gelungen war.

Die Reinigung von NirN (Abb. 3.23 B) führte zum Nachweis der ko-gereinigten NirS und NirF. Die Interaktion zwischen NirS und NirN wurde bereits durch Immunopräzipitation (3.8.2) nachgewiesen und konnte hiermit nochmals bestätigt werden. Der Nachweis von NirF beleuchtete das Interaktionsnetzwerk zwischen diesen drei Proteinen neu. Während durch *Pull-down*-Analysen von NirF (3.8.3) lediglich der Nachweis einer Interaktion zwischen NirF und NirS erbracht werden konnte, zeigte dieses Experiment unter Nutzung der nativen Proteine,

dass scheinbar eine direkte Interaktion zwischen NirF und NirN bestand. Der bereits diskutierte Einfluss des Strep-Tag auf die Protein-Protein-Interaktion (3.2.1, 3.8.3) schien sich durch dieses Ergebnis zu bestätigen.

Abb. 3.23 A zeigt darüber hinaus, dass eine deutliche Menge an NosZ (1.2.2) detektiert wurde. Die N<sub>2</sub>O-Reduktase katalysiert den letzten Schritt der Denitrifikation in *P. aeruginosa* (Zumft, 1997). Die Ko-Reinigung von NosZ mit NirS gab einen neuen Einblick in die Denitrifikation von *P. aeruginosa* (Zumft, 1997). Dieses Ergebnis wies auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen hin. Möglicherweise kommt es im Zuge der Denitrifikation *in vivo* zur Ausbildung eines (schwachen) Komplexes zwischen den drei Denitrifikationsenzymen, NirS (Reduktion von Nitrit), NorBC (Reduktion von Stickstoffmonoxid) und NosZ (Reduktion von Distickstoffmonoxid), was einen Nachweis der Protein-Protein-Interaktion zwischen NirS und NosZ durch diese Methode ermöglichte. Der Proteinkomplex aus NorBC konnte nicht in signifikanten Mengen ko-gereinigt werden, was möglicherweise an der Bindung des Proteins in der inneren Membran lag (Hino *et al.*, 2010). Zwar konnte NirF in den beiden Immunoaffinitätschromatographien nachgewiesen werden, obwohl es ebenfalls ein membranassoziiertes Protein darstellte (3.2), dennoch waren möglicherweise die Inkubationszeit und das verwendete Puffersystem nicht ausreichend, um ein Protein mit mehreren Transmembranhelices zu solubilisieren. Eine direkte Interaktion zwischen den Enzymen NirS, NorBC und NosZ könnte für den Organismus sinnvoll sein, da die toxischen Zwischenprodukte der Denitrifikation so möglicherweise direkt zum Folgeenzym weitergegeben werden könnten.

Die in Abb. 3.23 gezeigten SDS-PA-Gele in A ( $\alpha$ NirS) und B ( $\alpha$ NirN) zeigten auch viele Hintergrundproteine. So befanden sich im Bereich der kleinen relativen Molekularmassen (ca. 5'000 -20'000) ribosomale Proteine. Diese sind auf deren Bindefähigkeit zum Säulenmaterial zurückzuführen und waren ebenfalls in den Kontrollen sichtbar (Anhang 4). Es kam vereinzelt auch zu neuen Banden im Bereich hoher relativer Massen, diese ließen sich über nicht aufgebrochene vernetzte Proteinkomplexe erklären.

Die Kontrollen der Immunoaffinitätschromatographien von NirS und NirN hätten zusätzlich mittels Massenspektrometrie vermessen werden können. Die hier verwendete Methode der Kontrolle durch optischen Vergleich stellte zwar eine gute Annäherung dar, verpflichtete jedoch auch zu einer vorsichtigen Interpretation der hier erhaltenen Daten. Da eine Messung der Kontrollen logistisch nicht möglich war, wurden die Daten so interpretiert, dass mehrere Ansprüche an die erhaltenen Daten gestellt wurden. Zunächst wurden nur Proteinsignale ausgewertet, die laut der *Pseudomonas*-Datenbank (Winsor *et al.*, 2011) durch Proteine zu-

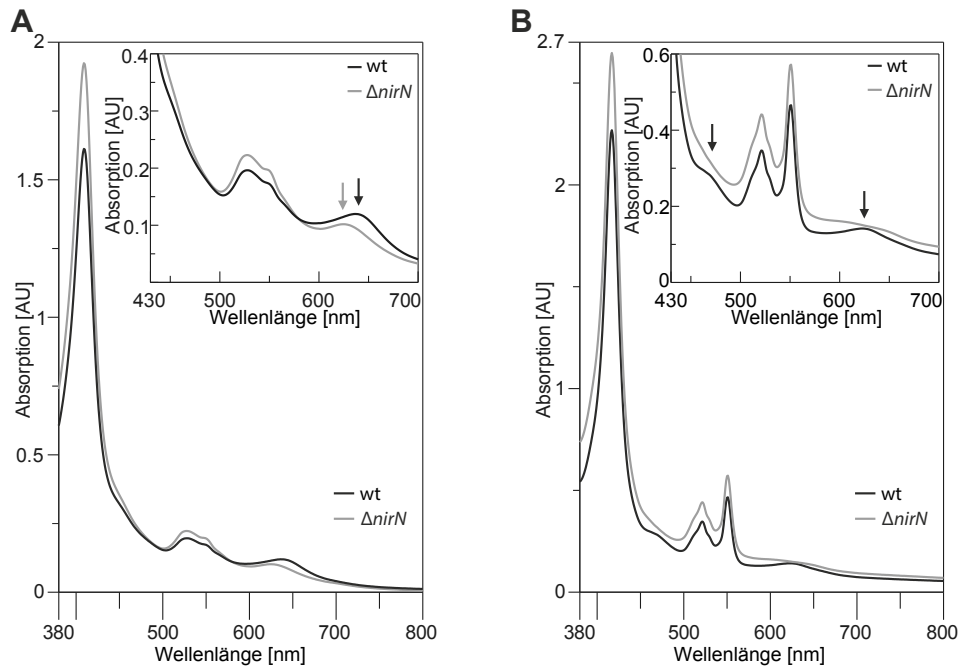
stande kamen, die zur inneren oder äußeren Membran, dem Periplasma oder *Outer Membran Vesicles* (OMV) zuzuordnen waren. Ferner wurde darauf geachtet, dass die relativen Molekulargewichte der Proteine zu den durch Proteingrößenstandards abgeschätzten relativen Molekulargewichten passten. Zusätzlich zu den beschriebenen Einschränkungen der Methode soll darauf hingewiesen werden, dass IVPCL (2.7.9) zwangsläufig zu einem höheren Hintergrund führte, der sich in dieser Methode besonders dadurch zeigte, dass die Antigene in jeder ausgeschnittenen und analysierten Probe zu finden waren (Anhang 5). Ferner könnte IVPCL durch die zusätzliche Massenveränderung der Proteine des Extraktes die massenspektrometrische Analyse erschwert haben. Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass die Extraktion der Proteinfragmente aus den Gelstücken von einem veränderten Standardprotokoll profitiert hätte (pers. Mitteilung Dr. M. Nimtz, 2012). Hier wurden hauptsächlich kurze Proteinfragmente aus den Gelen isoliert und nur wenige längere Peptidsequenzen detektiert, die eine Identifizierung verbessert hätten.

Trotz der ein oder anderen technischen Limitierung der Methode kann zu diesem Experiment festgehalten werden, dass es möglich war, die zum Teil bereits nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen von NirN und NirS in beide Richtungen zu bestätigen. Darüber hinaus wiesen diese Ergebnisse auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NirF und NirN hin. Die detektierte Ko-Reinigung von NosZ mit NirS ließ Spekulationen zum Proteinnetzwerk während der Denitrifikation zu und führte zur Suche nach Interaktionspartnern von NosZ durch José Manuel Borrero de Acuna am Insitut für Mikrobiologie der TU Braunschweig, dessen Untersuchungen noch andauern.

### 3.9 Die *nirN*-Deletion führt zu verändertem

#### Häm $d_1$ -Gehalt in NirS

Die Deletion von *nirN* in *P. aeruginosa* führte zu einem schwach ausgeprägten Phänotyp, der ein verlangsamtes Wachstum und eine geringere Nitritreduktase-Aktivität zeigte als der vergleichbar behandelte wt-Stamm (Kawasaki *et al.*, 1997). Um die Auswirkungen einer *nirN*-Deletion genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit periplasmatische Fraktionen von *P. aeruginosa* PAO1 wt und *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$ , die für 8 h (anaerob) in LB-Medium und 50 mM NaNO<sub>3</sub>, bei 37 °C und 120 rpm kultiviert wurden (2.4.2), erzeugt (2.7.3). Anschließend wurden UV/Vis-Spektren von diesen Proben aufgenommen (2.8.6). Abbildung 3.24 zeigt die aufgenommenen Spektren im oxidierten (A) und reduzierten (B) Zustand.



**Abbildung 3.24: UV/Vis-Spektren von periplasmatischen Extrakten von *P. aeruginosa*.** Dabei wurden *P. aeruginosa*-Zellen entsprechend der in den Kapiteln 2.4.2, 2.7.3 und 2.8.6 beschriebenen Bedingungen kultiviert und periplasmatische Extrakte erzeugt. **A** zeigt die Spektren, wie sie durch Oxidation von Luftsauerstoff, erhalten werden. **B** zeigt Spektren nach der Reduktion mit Natriumdithionit. Die schwarze Linie kennzeichnet das Spektrum von *P. aeruginosa* PAO1 wt (**wt**). Die graue Linie zeigt das Spektrum von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$  ( **$\Delta nirN$** ). Die Unterschiede der Spektren sind durch Pfeile hervorgehoben.

In Abb. 3.24 A ist zu erkennen, dass die aufgenommenen UV/Vis-Spektren identische Absorptionsmaxima bei 409 nm (Soret-Bande), 527 nm und 549 nm (Q-Banden) aufwiesen unabhängig davon, aus welchem Stamm die Probe präpariert wurde. Dieses Verhalten ging auf die in den periplasmatischen Fraktionen vorhandenen c-Typ Cytochrome der beiden Proben zurück. Dennoch waren im Bereich von 620-640 nm Unterschiede zwischen den beiden Proben zu sehen. Die wt-Probe zeigte hier ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei 638 nm, das auf die oxidierte Form der Häm  $d_1$ -enthaltenden Nitritreduktase zurückzuführen war (Barber *et al.*, 1976). Die  $\Delta nirN$ -Probe zeigte ein abweichendes Verhalten mit einem weniger intensiven und verschobenen Maximum bei 624 nm. Dieses deutete nicht auf die normale oxidierte Form der holo-NirS hin.

Die nach Zugabe von Natriumdithionit aufgenommenen UV/Vis-Spektren (Abb. 3.24 B) zeigten die reduzierten Formen der in den Proben enthaltenen Cytochrome. Wie bei A wiesen die Spektren beider Proben in B ein gleiches Absorptionsmuster bei 417 nm (Soret-Bande), 521 nm und 551 nm (Q-Banden) auf, die zugleich den Signalen von reduzierten c-Typ Cytochromen entsprachen. Außerdem zeigten beide Proben erneut ein unterschiedliches Verhalten

im Bereich der Häm  $d_1$ -Absorption. Die wt-Probe zeigte ein Absorptionsmaximum bei 623 nm und eine Schulter bei 468 nm. Diese beobachteten Spektrenverschiebungen sind laut Literatur auf die Reduktion von in NirS gebundenem Häm  $d_1$  durch Natriumdithionit zurückzuführen (Barber *et al.*, 1976, Hill & Wharton, 1978, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991 und Suzuki *et al.*, 2006). Die  $\Delta nirN$ -Probe zeigte lediglich ein breites Absorptionssignal zwischen 580 nm und 670 nm. Außerdem fehlte die Absorptionsschulter bei 468 nm (vgl. wt).

Ein weiterer, wenngleich nur mit Vorsicht zu interpretierender, Unterschied lag in der Intensität der Häm  $d_1$ -spezifischen Absorptionsbanden. Obwohl die  $\Delta nirN$ -Probe höhere Intensitäten im Bereich der  $c$ -Typ Cytochrom-typischen Absorptionsmaxima zeigte, fielen die Intensitäten der Häm  $d_1$ -Absorptionsbanden geringer aus. Trotz gleicher Mengen an NirS in der Probe (überprüft durch Western-Blot-Analyse, nicht gezeigte Daten), deutete dies darauf hin, dass die im  $\Delta nirN$ -Stamm vorkommende NirS nicht über die gleiche Menge an Kofaktor verfügte, bzw. die NirS nicht vollständig mit Häm  $d_1$  gesättigt zu sein schien. Diese Interpretation setzte allerdings voraus, dass es sich bei beiden Proben um den gleichen Kofaktor handelte. Läge in der  $\Delta nirN$ -Probe ein Kofaktorvorläufer (z. B. Dihydrohäm  $d_1$ ) vor, könnte das Vorläufermolekül über einen anderen Extinktionskoeffizienten verfügen, der eventuell geringer ausfallen würde.

Tatsächlich ließen die beobachteten Unterschiede darauf schließen, dass die Abwesenheit von NirN zu einer Veränderung in der Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase-Biogenese führte. Zwar resultierte eine *nirN*-Deletion nur in einem schwachen Wachstumsphänotyp und einer leicht erniedrigten *in vivo* Aktivität der NirS (Kawasaki *et al.*, 1997), dennoch schien unter diesen Bedingungen eine bisher nicht näher charakterisierte Form der Nitritreduktase gebildet worden zu sein. Dies warf zwangsläufig die Frage auf, welche Rolle die NirN in *P. aeruginosa* spielt. Drei mögliche Aufgaben der NirN werden im Folgenden diskutiert.

NirN könnte dafür zuständig sein, den Kofaktor Häm  $d_1$  korrekt in der Nitritreduktase zu positionieren. Eine falsche Koordination des Kofaktors im aktiven Zentrum der NirS könnte einen Einfluss auf das Absorptionsspektrum ausüben. Diese alternative Koordination resultiert möglicherweise in einer aktiven Form der NirS, die nicht über die gleiche Aktivität wie die wt-NirS verfügt. Allerdings ist bekannt, dass semi-apo-NirS *in vitro* durch Häm  $d_1$ -Zugabe rekonstituiert werden kann, was die normale Aktivität und die gewöhnlichen Absorptionscharakteristika der NirS zufolge hat (Hill & Wharton, 1978, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991 und Silvestrini *et al.*, 1992). Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die Aufgabe der NirN nur darin besteht den Kofaktor richtig in der NirS zu positionieren.

In Anbetracht der niedrigeren Absorptionsintensitäten in Abwesenheit von NirN könnte NirN *in vivo* wichtig für den allgemeinen Kofaktoreinbau in die Nitritreduktase sein. Fehlt die NirN unter den *in vivo* auftretenden Bedingungen, so könnte eine gehemmte Insertion des Kofaktors in NirS zu weniger aktiver hNirS führen. Dies könnte den schwachen Wachstumsphänotyp, die niedrigere NirS-Aktivität und die schwachen Absorptionsbanden im Bereich der Häm  $d_1$ -Maxima erklären. Nichtsdestotrotz erklärt es nicht die Verschiebung der Absorptionsbanden zu anderen Wellenlängen und erscheint daher eher eine zusätzliche Aufgabe der NirN darzustellen. Denn auch hier gilt, dass eine Rekonstitution der Nitritreduktase ohne NirN *in vitro* sehr leicht herbeigeführt werden kann.

Die letzte mögliche Interpretation der Ergebnisse und damit der Rolle der NirN, bezieht sich darauf, dass es sich bei der im  $\Delta nirN$ -Stamm vorliegenden Nitritreduktase zwar größtenteils um eine aktive holo-NirS handelte, diese jedoch einen „falschen“ Kofaktor trug. Dieser Kofaktor könnte weiterhin prinzipielle Aktivität vermitteln, diese wäre aber schwächer ausgeprägt. Die sinnvollste Variante eines alternativen Kofaktors wäre der letzte Häm  $d_1$ -Vorläufer, Dihydrohäm  $d_1$  (Abb. 1.11). Somit würde NirN eine Rolle als Häm  $d_1$ -Biosyntheseprotein bzw. zumindest als Protein mit Beteiligung an der Häm  $d_1$ -Biosynthese zukommen. Dieser letzte Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese wäre das Einführen der Doppelbindung in die Propionatseitenkette an Ring D. Diese Hypothese wird durch zwei weitere Fakten unterstützt. Zum einen zeigte Chang (1994), dass eine Dihydrohäm  $d_1$ -haltige Nitritreduktase *in vitro* aktiv war, wobei eine solche holo-NirS weniger aktiv als eine Häm  $d_1$ -enthaltende Form der Nitritreduktase war. Zum anderen sollte Dihydrohäm  $d_1$  über leicht veränderte Absorptionseigenschaften im Vergleich zu Häm  $d_1$  verfügen. Durch das kürzere  $\pi$ -Elektronensystem in Dihydrohäm  $d_1$  sollte es zu einer hypsochromen Verschiebung, also einer Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen, kommen. Dies wurde so bereits 1986 von Chang *et al.* bei einer Hydrierung der Acrylatseitenkette von isoliertem Häm  $d_1$  gezeigt, durch die es zu einer Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen im hydrierten Häm  $d_1$ -Spektrum kam. Auch das Absorptionsspektrum der NirS-Form, die im  $\Delta nirN$ -Stamm vorlag, war im Bereich der Häm  $d_1$ -Absorption zu einer kürzeren Wellenlänge hin verschoben. Aus diesen Gründen erscheint eine Rolle der NirN in der Häm  $d_1$ -Biosynthese als sinnvollste Interpretation der vorliegenden Ergebnisse, wobei in Abwesenheit von NirN nur Dihydrohäm  $d_1$  gebildet wird. Dennoch liegt es im Bereich des Möglichen, dass NirN nicht alleine die Dehydrogenierungsreaktion an Dihydrohäm  $d_1$  vollzieht, sondern dabei mit NirF zusammenarbeitet. Wie aus den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit ersichtlich wurde, gibt es eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen.

Bei Versuchen den vorliegenden Kofaktor der NirS aus dem  $\Delta nirN$ -Stamm zu untersuchen, wurde die Nitritreduktase aus dem *nirN*-Deletionsstamm (nach Kultivierung in 10 L LB-Medium, 50 mM NaNO<sub>3</sub>, ü.N. bei 37 °C und 120 rpm) nach dem Standardprotokoll (2.7.7) gereinigt. Dabei wurde allerdings lediglich die Cytochrom c-Form der NirS erhalten. Offensichtlich ging der hier vorhandene, zu untersuchende Kofaktor während der Reinigung, möglicherweise bei der Dialyse, verloren. Dies deutete entweder auf einen falschen Einbau von Häm  $d_1$  in der NirS hin, wodurch der Kofaktor nicht entsprechend fest im Protein gebunden wurde und herausdissoziierte. Oder es sprach alternativ für Dihydrohäm  $d_1$  als vorliegende Kofaktorvariante, die aufgrund der fehlenden Doppelbindung nicht so fest im Protein gebunden wurde wie der native Kofaktor und dadurch während der Reinigung verloren ging.

Um diesen Sachverhalt weiter zu beleuchten, sollte versucht werden ein Resonanz-Raman-Spektrum, sowohl von der wt-NirS als auch von der  $\Delta nirN$ -NirS aufzunehmen, da diese spektroskopische Methode ermöglichen sollte einen Unterschied zwischen Häm  $d_1$  und der hydrierten Variante festzustellen. Dennoch ist ein solches Experiment sehr schwer durchzuführen, da hohe Mengen an gereinigtem Protein benötigt werden. Dabei könnte eine im großen Maßstab angelegte Immunoaffinitätsreinigung der NirS aus beiden Stämmen zielführender sein, als das herkömmliche Reinigungsprotokoll, bei dem der alternative Kofaktor verloren geht.

### 3.10 Modell der NirS-Maturation im Periplasma

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einblicke in die Zusammenhänge der Maturation der Cytochrom  $cd_1$  Nitritreduktase. Wie bekannt ist, handelt es sich bei NirS um ein periplasmatisches, homodimeres Protein (Zumft, 1997 und Nurizzo *et al.*, 1997). Die Insertion der beiden Kofaktoren Häm c und Häm  $d_1$  findet im Periplasma statt. Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch nicht klar, welcher der beiden Kofaktoren nach dem Transport der NirS ins Periplasma zuerst in das apo-Protein eingebaut wird.

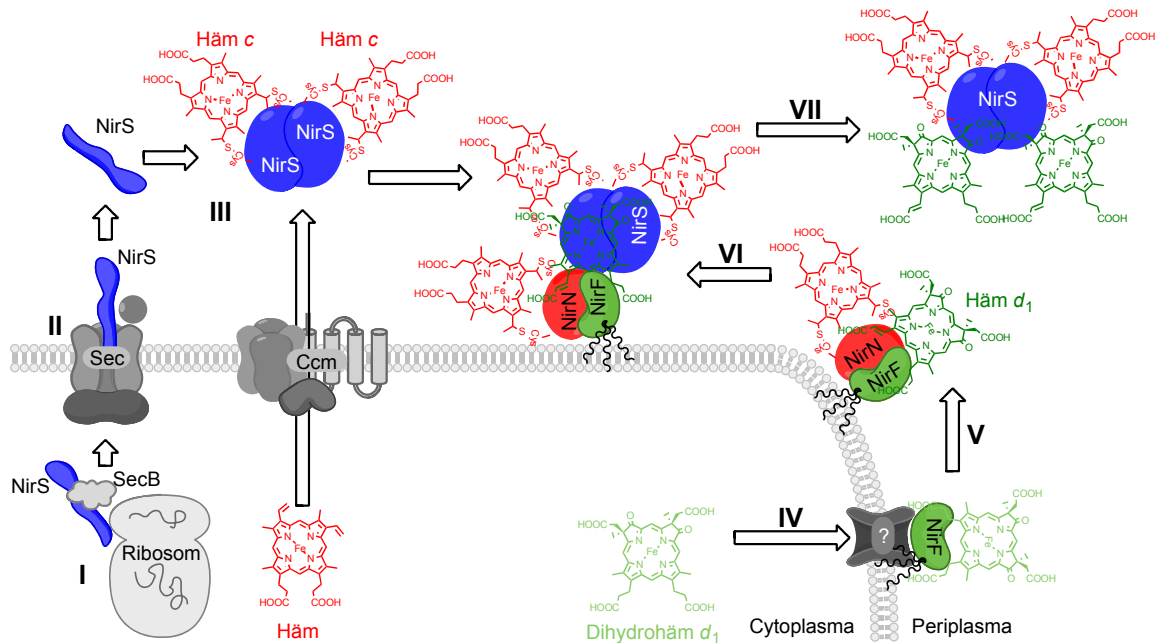
Allerdings war seit längerem bekannt, dass sich nach dem Entfernen des Häm  $d_1$ -Kofaktors durch Extraktion eine stabile, lösliche saNirS gewinnen lässt (Weeg-Aerssens *et al.*, 1991). In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine saNirS in *E. coli* produziert werden. Wie sich zeigte (3.4.4), handelte es sich bei der Häm c-bindenden Form der NirS um ein äußerst stabiles Protein. Dieses Protein lag ebenso wie die holo-Form bereits als Homodimer vor. Dies steht in Einklang mit der rekombinant in *P. putida* produzierten saNirS aus *P. aeruginosa* (Silvestrini *et al.*, 1992).

Alle diese Hinweise deuten stark darauf hin, dass der Einbau von Häm *c* vor der Insertion des Häm *d*<sub>1</sub>-Kofaktors vollzogen wird. Weiterhin ist davon auszugehen, dass es spätestens nach der Verknüpfung von NirS und Häm *c* zur Ausbildung des NirS-Homodimers kommt. Ob das Dimer jedoch erst nach dem Einbau des Häm *c*-Kofaktors gebildet wird, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Die in Abbildung 1.6 gezeigte Struktur von hNirS aus *P. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 1997) lässt erkennen, dass der N-terminale Bereich eines Monomers des Proteins wie ein langer Arm um die Häm *c*-bindende Domäne des zweiten Monomers der NirS gelegt wird. Da die Struktur der Häm *c*-bindenden Domäne maßgeblich durch die Koordinierung des Kofaktors bestimmt wird, kann angenommen werden, dass die Interaktion zwischen diesen Teilen des Proteins erst nach dem Einbau des Kofaktors vollzogen wird. Dennoch wird aus Abb. 1.6 deutlich, dass eine große Interaktionsfläche zwischen den beiden Häm *d*<sub>1</sub>-bindenden Domänen besteht, welche bereits für eine Dimerisierung des Proteins reichen könnte. Silvestrini *et al.* zeigten 1996 durch gezielten proteolytischen Verdau allerdings, dass eine Häm *d*<sub>1</sub>-bindende Domäne von NirS ohne die Häm *c*-bindende Domäne nur als Monomer vorlag. Ein Dimer trat dort nur auf, sofern mindestens eine Häm *c*-bindende Domäne vorhanden war. Da die Experimente von Silvestrini *et al.* (1996) mit den Kofaktor-enthaltenden Formen von NirS durchgeführt wurden, kann zwar gefolgert werden, dass die Häm *c*-bindende Domäne für die Dimerisierung der NirS essenziell ist. Jedoch lassen diese Experimente noch keinen Schluss darüber zu, ob dazu auch ein Häm *c* gebunden sein muss oder nur die Peptidstruktur der Häm *c*-bindenden Domäne notwendig ist.

In dem derzeitigen Modell für die Kofaktorinsertion in die NirS kommt es also zuerst zur Dimerisierung und kovalenten Anbindung von Häm *c* an NirS durch das Ccm I-System (Thöny-Meyer, 2002), bevor anschließend das Häm *d*<sub>1</sub> eingebaut wird. Welcher der beiden Schritte, Dimerisierung oder Häm *c*-Einbau, zuerst abläuft ist gegenwärtig noch unklar. Das hypothetische Modell der ablaufenden Prozesse zur Maturation der NirS ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Das Modell in Abb. 3.25 zeigt, dass das Protein NirF (grün) als Lipoprotein in der inneren Membran von *P. aeruginosa* verankert ist (3.1.1, 3.2.2 und Remans *et al.*, 2010). Obwohl es sich bei NirF nur in *P. aeruginosa* und wenigen anderen Denitrifizierern um ein Lipoprotein handelt, deutet diese Verankerung des Proteins in der inneren Membran darauf hin, dass NirF das erste periplasmatische Nir-Protein sein könnte, das in Interaktion mit Häm *d*<sub>1</sub> (dunkelgrün, Abb. 3.25) oder besser dessen Vorläufermolekül Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> (hellgrün, Abb. 3.25) tritt. Möglicherweise interagiert NirF dabei direkt mit dem noch unbekannten





**Abbildung 3.25: Modell zum letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese und Insertion des Kofaktors in die Nitritreduktase in *P. aeruginosa*.** Die Abbildung zeigt ein Modell zum Ablauf der Maturation der NirS (blau) aus *P. aeruginosa*. Dabei wird NirS zuerst im Cytoplasma gebildet (I) und mittels des Sec-Transportwegs ins Periplasma sekretiert (II). Danach schließt sich die Verknüpfung von Häm  $c$  (rot) mit NirS durch das Ccm I-System an (III). Ob die Dimerisierung vor oder nach dem Einbau von Häm  $c$  erfolgt ist unklar. Dihydrohäm  $d_1$  (hellgrün) wird im Cytoplasma gebildet. Der Export ins Periplasma erfolgt durch einen noch unbekannten Transportmechanismus (IV). Auf der peri-plasmatischen Seite der inneren Membran ist NirF (grün) mit seiner Lipidmodifikation verankert. Somit stellt es möglicherweise das Protein dar, welches den Häm  $d_1$ -Vorläufer im Periplasma aufnimmt. Die Reaktion von Dihydrohäm  $d_1$  zu Häm  $d_1$  (dunkelgrün) wird möglicherweise von einem Komplex aus NirF und NirN (rot) durchgeführt (V). Dieser Komplex tritt im Anschluss mit der semi-apo-NirS in Interaktion und inseriert den Kofaktor in das aktive Zentrum der Nitritreduktase (VI). Über die stöchiometrische Zusammensetzung eines solchen Komplexes kann bisher keine Aussage getroffen werden. Schließlich wird die aktive holo-NirS freigesetzt (VII).

Kofaktor-Transporter, der sich als Transmembranprotein ebenfalls in der inneren Membran befinden sollte. Über die Natur dieses Transporters ist bisher nahezu nichts bekannt. Die einzige bekannte Vermutung über einen möglichen Transporter wurde von Xiong *et al.* (2007) geäußert. Xiong *et al.* spekulierten, dass Ccs1 (CcsB) und CcsA eine Rolle für den Häm  $d_1$ -Transport in den grampositiven Bakterien *Heliobacillus mobilis* und *Heliophilum fasciatum* spielen könnten. Dies schlossen sie aus bioinformatischen Analysen eines Genclusters in dem Homologe zu den Häm  $d_1$ -Biosyntheseproteinen NirD, NirL und NirJ in naher Umgebung zu *ccs1* und *ccsA* auftraten. Allerdings sind die Proteine Ccs1 und CcsA ein wesentlicher Bestandteil des Cytochrom  $c$  Maturationssystems II (Ccm II-System), wie es in grampositiven Bakterien, Algen- und Pflanzenchloroplasten vorkommt (Simon & Hederstedt, 2011). Zudem wurde bisher noch

nicht nachgewiesen, dass *Heliobacteria* überhaupt eine Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase besitzen. Die Interpretation von Xiong *et al.* (2007) geht daher womöglich auf eine Fehleinschätzung zurück. Die beiden untersuchten grampositiven *Heliobacteria* scheinen eine ähnliche alternative Häm-Biosynthese wie die Archaea durchzuführen (Storbeck *et al.*, 2010 und Bali *et al.*, 2011). Demnach handelt es sich bei den NirJ-, NirD- und NirL-Homologen wahrscheinlich um Enzyme der alternativen Häm-Biosynthese und nicht um Häm *d*<sub>1</sub>-Biosyntheseproteine. Folglich ist auch die von Xiong *et al.* (2007) vorgeschlagene Beteiligung von Ccs1 und CcsA am Dihydrohäm *d*<sub>1</sub>-Transport ins Periplasma fraglich. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Ringe C und D von Häm und Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> ist ein möglicher Transport des Tetrapyrrols zur periplasmatischen über CcmBCD des Ccm I-Systems in *P. aeruginosa* trotzdem nicht komplett ausgeschlossen.

Wie in 1.4.4.5 beschrieben wird derzeit angenommen, dass der letzte Schritt der Häm *d*<sub>1</sub>-Biosynthese im Periplasma abläuft und dort die Doppelbindung in die Propionatseitenkette des D-Rings von Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> eingeführt wird. Bali *et al.* (2011) vermuteten, dass NirF diese Reaktion katalysieren könnte. Die in dieser Arbeit gezeigten Absorptionsspektren der periplasmatischen Proteinfraction einer *P. aeruginosa* PAO1-Mutante, die kein NirN mehr bildet, geben allerdings Grund zur Spekulation, dass NirN ebenfalls an diesem Biosyntheseschritt beteiligt sein könnte (3.9). Die  $\Delta nirN$ -Mutante zeigte ein abweichendes Absorptionsspektrum im Bereich der Häm *d*<sub>1</sub>-Absorption im Vergleich zum wt-Stamm. Diese Abweichungen könnten, wie beschrieben, als Absorptionsspektrum von Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> interpretiert werden. Darüber hinaus zeigten die hier durchgeführten Interaktionsexperimente (3.8.4), dass NirN und NirF miteinander interagieren. All diese Beobachtungen führen zu der Hypothese (Abb. 3.25), dass NirN und NirF ein Heterodimer bilden und zusammen die Umsetzung der Propionatseitenkette von Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> katalysieren. Da sich die Propionatseitenketten von Ring C und D des Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> chemisch betrachtet sehr ähneln, kann die Ausbildung eines solchen Heterodimers die selektive Umsetzung der Ring D-Seitenkette unterstützen. Weiterhin wird in dem hier vorgeschlagenen Modell postuliert, dass NirF essentiell für die Aufnahme des Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> aus der Membran ist. Das hier vorgeschlagene Modell lässt sich auch mit den in der Literatur beschriebenen Phänotypen von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirF$  bzw.  $\Delta nirN$ -Mutanten in Einklang bringen. In einer  $\Delta nirF$ -Mutante wird keine aktive holo-NirS gebildet (Kawasaki *et al.*, 1997). Das deutet auf eine essenzielle Rolle von NirF bei der Aufnahme des Dihydrohäm *d*<sub>1</sub> aus der Membran hin, zusätzlich zu seiner möglichen Rolle für den letzten Biosyntheseschritt. Wenn NirF fehlt, gelangt der Häm *d*<sub>1</sub>-Vorläufer nicht ins Periplasma und es wird

keine aktive NirS gebildet. Wäre NirF ausschließlich an der Katalyse des letzten Biosyntheseschritts beteiligt, so könnte in der Abwesenheit von NirF das Dihydrohäm  $d_1$  an NirS binden, was zu einer semi-aktiven holo-NirS führen würde. In Abwesenheit von NirN kann NirF den Kofaktorvorläufer noch ins Periplasma transportieren, aber der letzte Schritt der Biosynthese, an dem NirN laut diesem Modell beteiligt ist, kann nicht mehr ablaufen. Dies könnte zum Einbau des Dihydrohäm  $d_1$  in die NirS führen und damit zu einer semi-aktiven Nitritreduktase. In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigt die *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$ -Mutante nur moderat langsames Wachstum als der wt-Stamm, d. h. eine aktive NirS wird gebildet. Zusätzlich konnte Chang (1994) zeigen, dass eine NirS mit Dihydrohäm  $d_1$  ebenfalls aktiv ist und die Insertion eines solchen Kofaktors auch *in vitro* leicht durchgeführt werden kann ohne Insertionsproteine dafür zu benötigen (Hill & Wharton, 1978, Weeg-Aerssens *et al.*, 1991 und Silvestrini *et al.*, 1992).

Zusammengefasst wird hier also vorgeschlagen, dass NirF wichtig ist für die Aufnahme von Dihydrohäm  $d_1$  aus der inneren Membran und dann anschließend NirN, möglicherweise gemeinsam mit NirF, den letzten Biosyntheseschritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese katalysiert. Allerdings bleibt dies zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ und dieser Vorschlag muss in künftigen Arbeiten experimentell überprüft werden.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zur Ausbildung einer Interaktion zwischen NirN und NirS kam (3.8.2.2 und 3.8.4). Diese war zudem abhängig von der Anwesenheit von NirF (3.8.2.3). Ob dies ausschließlich auf die Verfügbarkeit von NirF zurückzuführen ist, oder ob das Vorhandensein des Häm  $d_1$ -Kofaktors Einfluss auf diese Interaktion hat, ist derzeit noch unklar. Allerdings konnte eine weitere Interaktion zwischen NirS und NirF detektiert werden (3.8.3 und 3.8.4). Diese erhaltenen Interaktionsergebnisse lassen es zu, über einen tertiären Komplex aus den Proteinen NirS, NirN und NirF zu spekulieren, der für den Insertionsprozess des Kofaktors in die Nitritreduktase wichtig ist. Nachdem in einem solchen Komplex der Kofaktor in die entsprechende Bindetasche inseriert wurde, würden die beteiligten Enzyme rasch dissoziieren, was die Bildung der freien holo-NirS zur Folge hätte. Die Abb. 3.25 zeigt einen solchen Zustand aus den drei Proteinen, wobei zu einer möglichen Stöchiometrie aufgrund fehlender experimenteller Daten noch keine Annahmen getroffen werden können.

## 4 Zusammenfassung

Die Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* ist ein strukturell und biochemisch gut charakterisiertes Protein. Trotz der vielen bekannten Eigenschaften des Proteins ist wenig über die Biosynthese und nahezu nichts über den Einbau des essenziellen Kofaktors Häm *d*<sub>1</sub> in die NirS bekannt. Diese Arbeit diente dazu, neue Erkenntnisse über die Rolle der Proteine NirF und NirN zu gewinnen, die an den letzten Schritten der Kofaktor-Biosynthese und dessen Insertion in die NirS beteiligt sein könnten.

Zunächst wurden NirF und NirN aus *P. aeruginosa* *in silico* analysiert. Nachdem festgestellt wurde, dass NirF eine Lipoprotein-Signalsequenz besitzt, wurde die Assoziation des Proteins an der inneren Membran von *P. aeruginosa* durch isopyknische Saccharose-Gradientenzentrifugation und Western-Blot-Analysen bewiesen. Um weitere biochemische Untersuchungen an der NirF durchführen zu können, wurde in dieser Arbeit das NirF-Homolog aus *D. shibae* rekombinant in *E. coli* produziert und zur Homogenität gereinigt.

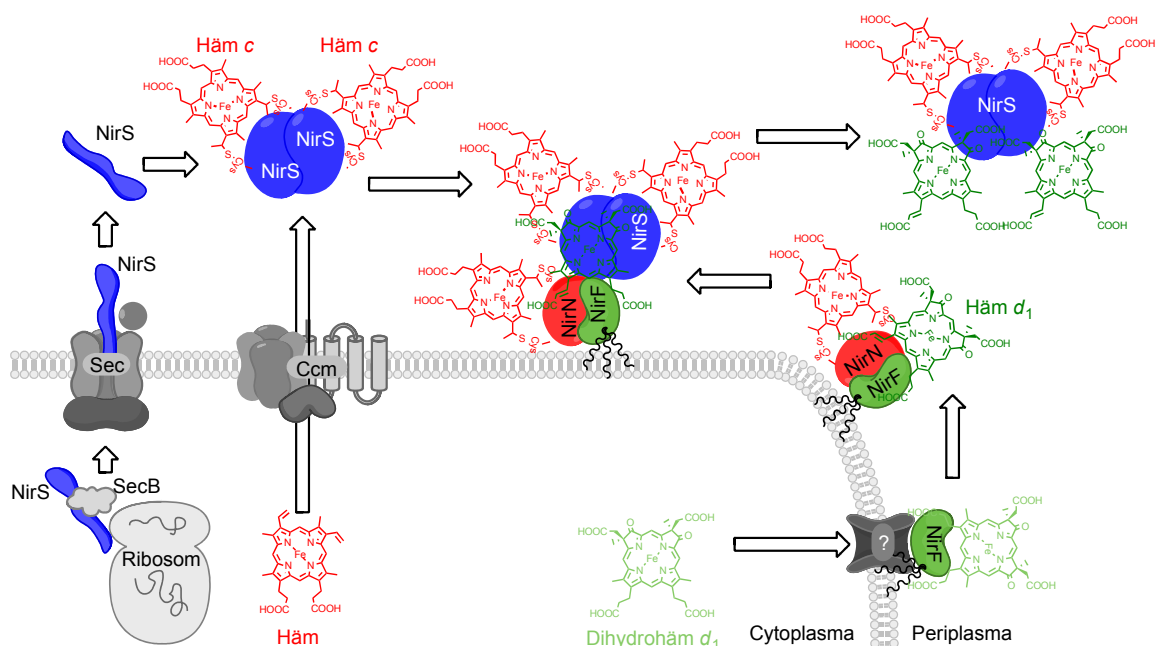
Die NirS aus *P. aeruginosa* wurde in einer Häm *d*<sub>1</sub>-bindenden Form gereinigt und zur Kofaktorgewinnung verwendet. Die Häm *d*<sub>1</sub>-Extraktion konnte erfolgreich durchgeführt werden, wodurch dieser Kofaktor zukünftig für weitere biochemische Untersuchungen wie Bindungs- und Transferstudien zur Verfügung steht. Darüber hinaus wurde eine Häm *d*<sub>1</sub>-freie NirS erstmals in *E. coli* produziert und in großem Maßstab gereinigt. Das hochreine Protein konnte zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern eingesetzt werden, die in Western-Blot-Analysen, Immunopräzipitationen und Immunoaffinitätsreinigungen zum Einsatz kamen. Darüber hinaus kann diese saNirS zukünftig als Häm *d*<sub>1</sub>-Akzeptor in Kofaktortransferstudien eingesetzt werden.

Das *c*-Typ Cytochrom NirN konnte produziert, gereinigt und in initialen Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden. Außerdem konnten spezifische Antikörper gegen NirN erzeugt werden. Diese Antikörper wurden ebenfalls in verschiedenen Experimenten erfolgreich eingesetzt.

In einer Reihe von Interaktionsexperimenten zwischen NirN und NirS konnte durch Ko-Immunopräzipitation und Immunoaffinitätschromatographie nach *in vivo* Protein-cross-linking erst-

mals ein Komplex zwischen den Proteinen NirS und NirN nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten diese Experimente und zusätzliche *Pull-down*-Analysen von NirF, dass dieses Protein ebenfalls an der Interaktion von NirN und NirS beteiligt ist und selbst mit diesen Proteinen interagiert. Die experimentelle Notwendigkeit von *in vivo* Protein-cross-linking deutete außerdem darauf hin, dass die Interaktionen zwischen diesen Proteinen nur schwach sind oder nur kurze Zeit bestehen. Darüber hinaus konnte die  $N_2O$ -Reduktase NosZ als Interaktionspartner von NirS identifiziert werden. Dies lässt eine mögliche direkte Weitergabe der toxischen Denitrifikationszwischenprodukte als möglich erscheinen.

Abschließend wurde die periplasmatische Fraktion einer *nirN*-Deletionsmutante von *P. aeruginosa* daraufhin untersucht, ob NirN an der Häm  $d_1$ -Biosynthese beteiligt sein kann. Dabei gab es erstmals Hinweise darauf, dass NirN am letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese oder der Kofaktorinsertion in NirS beteiligt sein könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit trugen wesentlich zum besseren Verständnis der im Periplasma von *P. aeruginosa* ablaufenden Prozesse zur Nitritreduktase-Maturation bei. Die Proteine NirN und NirF konnten in Zusammenhang mit den dort ablaufenden Prozessen gebracht werden und es konnte ein neues NirS-Maturationsmodell (Abb. 4.1) postuliert werden.



**Abbildung 4.1: Maturationsmodell der Nitritreduktase in *P. aeruginosa*:** NirS (blau) wird zunächst über den Sec-Transporter ins Periplasma transloziert. Dort erfolgen die Dimerisierung und der Häm c-Einbau (rot). NirF nimmt den Kofaktorvorläufer Dihydrohäm  $d_1$  (hellgrün) im Periplasma auf und katalysiert, möglicherweise zusammen mit NirN (rot), den letzten Schritt der Häm  $d_1$ -Biosynthese. Abschließend wird der fertige Kofaktor (grün) über einen Komplex aus NirF, NirN und NirS auf NirS übertragen.

## 5 Summary

NirS, the cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase of *P. aeruginosa* is a well characterized enzyme catalyzing the reduction of nitrite to nitric oxide. Despite its known structure and biochemical properties, less is known about the biogenesis of this protein. For a functional protein a covalently attached heme *c* at the N-terminus and a non-covalently bound heme *d*<sub>1</sub> in the C-terminal domain are essential. The biosynthesis and insertion of the second cofactor are poorly understood processes. The main objective of this work was to gain more insights into the roles of the proteins involved in the last step of heme *d*<sub>1</sub>-biosynthesis and cofactor-insertion into NirS.

A first analysis of the proteins NirF and NirN from *P. aeruginosa* *in silico* revealed a potential lipoprotein signal sequence of NirF responsible for the attachment of the protein to the periplasmic face of the inner membrane. This was proven by isopycnic sucrose gradient centrifugation and western-blot-analysis. The NirF-homolog from *D. shibae* was produced recombinantly in *E. coli* and purified to close homogeneity for further *in vitro* studies.

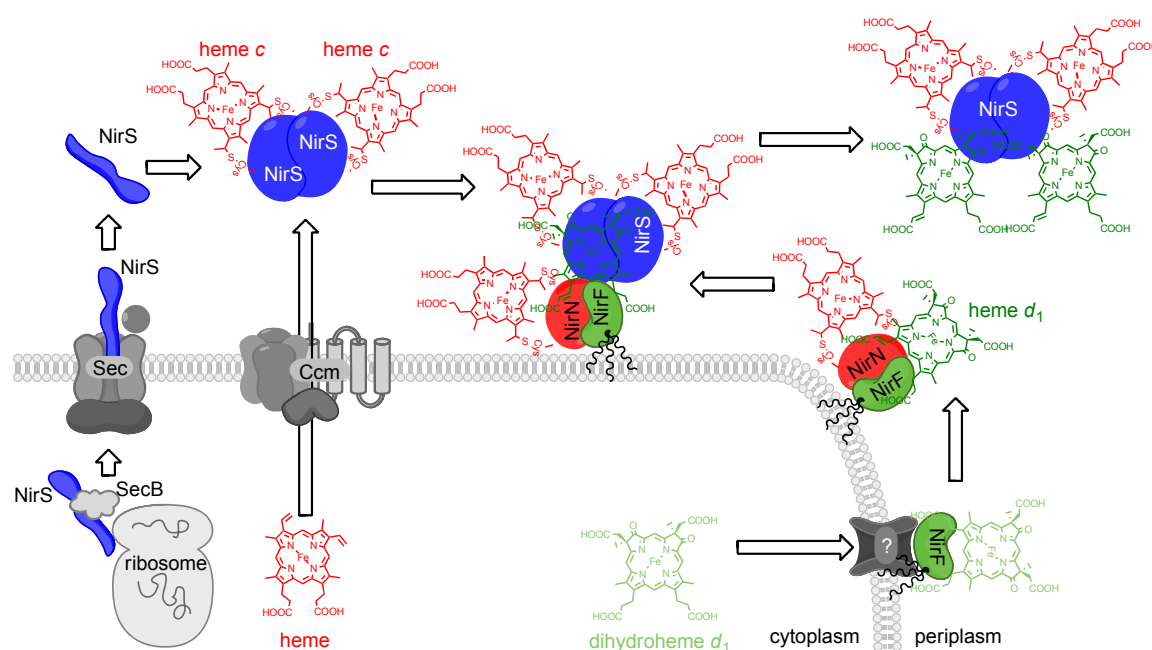
The nitrite reductase NirS was produced and purified in a heme *d*<sub>1</sub>-containing form. Heme *d*<sub>1</sub> was extracted from the protein and can now be used for further investigations, including cofactor-binding- and transfer-studies. Furthermore, a heme *d*<sub>1</sub>-free version of NirS was produced in *E. coli* for the first time, purified and used for generation of antibodies, which were used in western-blot-analysis, immunoprecipitations and immuno affinitychromatography.

The protein NirN was produced, purified and used in crystallization experiments as well as for generating specific monoclonal and polyclonal antibodies. These antibodies were successfully used in several experiments.

Interaction studies using co-immunoprecipitation and immunoaffinity chromatography revealed an interaction between NirS and NirN after *in vivo* protein-cross-linking. Furthermore, this interaction was dependent on the presence and interaction of NirF with the NirS-NirN-complex, which was shown in additional pull down-analysis and immunoaffinity chromatography. The experimental necessity of *in vivo* protein-cross-linking indicates a weak or transient interaction between these proteins. Additionally, the N<sub>2</sub>O-reductase NosZ was found to

be an interaction partner of NirS. This suggests a direct passing of toxic denitrification products between the involved enzymes.

After analyzing the periplasmic fraction of a *nirN*-deletion strain of *P. aeruginosa*, new insights into the involvement of NirN in the heme  $d_1$ -biosynthesis were gained. The results of this work led to a better understanding of the NirS maturation system and indicated the involvement of NirN and NirF in the last step of heme  $d_1$ -biosynthesis and cofactor-insertion into NirS. All results are combined in a new model for the NirS maturation (fig. 5.1).



**Figure 5.1: Model of the nitrite reductase maturation in *P. aeruginosa*:** NirS (blue) is translocated through the Sec-complex into the periplasm. First, the dimerisation and heme c-attachment (red) occur. NirF (green) is the first protein in the periplasm to take up the heme  $d_1$ -precursor (light green) and catalyzes, probably together with NirN (red), the last step of heme  $d_1$ -biosynthesis. NirF, NirN and NirS form a complex to insert the cofactor (green) in the active site of NirS.

## 6 Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen ein komplexes Interaktionsnetzwerk zwischen den periplasmatischen Nir-Proteinen. Darüber hinaus werden Fragen bezüglich der Rollen der Proteine NirF und NirN in *P. aeruginosa* aufgeworfen. Nachfolgende Studien sollten die folgenden Themengebiete adressieren:

### Interaktionsstudien:

- Durchführung von *in vitro* Interaktionsstudien mit NirS, NirN und NirF mit und ohne Häm  $d_1$  mittels Biacore-Analysen.
- *In vitro* Kofaktor-Bindungs- und Transportstudien mit den Proteinen NirF, NirN und NirS.

### Charakterisierung der NirF:

- Erzeugung von Antikörpern gegen NirF zur Durchführung einer Immunoaffinitätschromatographie nach *in vivo* Protein-cross-linking, mit dem Ziel einen Häm  $d_1$ -Transporter zu identifizieren.
- Kristallisationsexperimente mit der NirF aus *D. shibae*.

### Charakterisierung der NirN:

- Kristallisationsexperimente mit gebundenem Häm  $d_1$ , zur Aufklärung der NirN-Struktur.
- Strukturaufklärung des in NirS gebundenen Kofaktors in der *nirN*-Deletionsmutante von *P. aeruginosa* mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie.
- Synthese von Dihydrohäm  $d_1$ , um es in Enzymtests mit NirN und NirF einsetzen zu können.
- Enzymaktivitätstests mit NirN und NirF, um die Umsetzung von Dihydrohäm  $d_1$  zu Häm  $d_1$  zu zeigen.



## 7 Literaturverzeichnis

- Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995). The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*, **1261**, 279–284.
- Arai, H., Mizutani, M. & Igarashi, Y. (2003). Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **149**, 29–36.
- Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1990). Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome *c*<sub>551</sub> from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett*, **261**, 196–198.
- Arese, M., Zumft, W. G. & Cutruzzola, F. (2003). Expression of a fully functional *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas stutzeri*. *Protein Expr Purif*, **27**, 42–48.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. & Thöny-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb*<sub>3</sub> oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 744–747.
- Bali, S., Lawrence, A. D., Lobo, S. A., Saraiva, L. M., Golding, B. T., Palmer, D. J., Howard, M. J., Ferguson, S. J. & Warren, M. J. (2011). Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and *d*<sub>1</sub> heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 18260–18265.
- Bali, S., Warren, M. J. & Ferguson, S. J. (2010). NirF is a periplasmic protein that binds *d*<sub>1</sub> heme as part of its essential role in *d*<sub>1</sub> heme biogenesis. *FEBS J*, **277**, 4944–4955.
- Barber, D., Parr, S. R. & Greenwood, C. (1976). Some spectral and steady-state kinetic properties of *Pseudomonas* cytochrome oxidase. *Biochem J*, **157**, 431–438.
- Barkigia, K. M., Chang, C. K., Fajer, J. & Renner, M. W. (1992). Models of heme *d*<sub>1</sub>. Molecular structure and NMR characterization of an iron(III) dioxoisobacteriochlorin (porphyrin-dione). *J Am Chem Soc*, **114**, 1701–1707.
- Beale, S. I., Gough, S. P. & Granick, S. (1975). Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 2719–2723.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. & Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*, **6**, 167.
- Berkmen, M., Boyd, D. & Beckwith, J. (2006). Disulfide bond formation in the periplasm. In: *The periplasm*. (Ehrmann, M., Ed.), 122–140. ASM Press, Washington, DC.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513–1523.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.

- Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A., Layer, G. & Jahn, D. (2003). Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese. *J Biol Chem*, **278**, 46625–46631.
- Brindley, A. A., Zajicek, R., Warren, M. J., Ferguson, S. J. & Rigby, S. E. J. (2010). NirJ, a radical SAM family member of the  $d_1$  heme biogenesis cluster. *FEBS Lett*, **584**, 2461–2466.
- Brown, K., Tegoni, M., Prudêncio, M., Pereira, A. S., Besson, S., Moura, J. J., Moura, I. & Cambillau, C. (2000). A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol*, **7**, 191–195.
- Chang, C. K. (1994). Haem  $d_1$  and other haem cofactors from bacteria. *Ciba Found Symp*, **180**, 228–246.
- Chang, C. K., Timkovich, R. & Wu, W. (1986). Evidence that heme  $d_1$  is a 1,3-porphyrindione. *Biochemistry*, **25**, 8447–8453.
- Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Karamanou, S. & Economou, A. (2013). Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem J*, **449**, 25–37.
- Choi, K.-H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods*, **64**, 391–397.
- Cordas, C. M., Duarte, A. G., Moura, J. J. G. & Moura, I. (2013). Electrochemical behaviour of bacterial nitric oxide reductase - Evidence of low redox potential non-heme  $Fe_B$  gives new perspectives on the catalytic mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1827**, 233–238.
- Cutruzzolà, F., Rinaldo, S., Centola, F. & Brunori, M. (2003). NO production by *Pseudomonas aeruginosa*  $cd_1$  nitrite reductase. *IUBMB Life*, **55**, 617–621.
- Dailey, T. A. & Dailey, H. A. (2002). Identification of [2Fe-2S] clusters in microbial ferrochelatases. *J Bacteriol*, **184**, 2460–2464.
- Daltrop, O., Allen, J. W. A., Willis, A. C. & Ferguson, S. J. (2002). *In vitro* formation of a c-type cytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7872–7876.
- Detlefsen, D. J., Thanabal, V., Pecoraro, V. L. & Wagner, G. (1991). Solution structure of Fe(II) cytochrome  $c_{551}$  from *Pseudomonas aeruginosa* as determined by two-dimensional  $^1H$  NMR. *Biochemistry*, **30**, 9040–9046.
- Dunn, N. W. & Holloway, B. W. (1971). Pleiotrophy of *p*-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet Res*, **18**, 185–197.
- Düvel, J., Bertinetti, D., Müller, S., Schwede, F., Morr, M., Wissing, J., Radamm, L., Zimmermann, B., Genieser, H. G., Jänsch, L., Herberg, F. & Häussler, S. (2012). A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*, **88**, 229–236.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, **149**, 2005–2013.

- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol*, **186**, 4596–4604.
- Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999). High resolution crystal structure of a  $Mg^{2+}$ -dependent porphobilinogen synthase. *J Mol Biol*, **289**, 591–602.
- Gershoni, J. M. & Palade, G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1–15.
- Gomori, G. (2010). *Handbook of biochemistry and molecular biology, fourth edition*. CRC Press, Boca Raton.
- Hasegawa, N., Arai, H. & Igarashi, Y. (2001). Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 1223–1230.
- Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr*, **22**, 451–471.
- Hebert, D. N. & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*, **87**, 1377–1408.
- Hill, K. E. & Wharton, D. C. (1978). Reconstitution of the apoenzyme of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa* with heme  $d_1$  and other heme groups. *J Biol Chem*, **253**, 489–495.
- Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S. & Shiro, Y. (2010). Structural basis of biological  $N_2O$  generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science*, **330**, 1666–1670.
- Humphreys, D. P. (2006). Periplasmic expression of antibody fragments. In: *The periplasm*. (Ehrmann, M., Ed.), 361–388. ASM Press, Washington, DC.
- Jordan, P. M. (1994). Highlights in haem biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, **4**, 902–911.
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, **12**, 1652–1662.
- Kawasaki, S., Arai, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1995). Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome  $c_{551}$  (*nirSM*) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme  $d_1$ . *Gene*, **167**, 87–91.
- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1997). Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme  $d_1$  biosynthesis. *J Bacteriol*, **179**, 235–242.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, **4**, 363–371.
- Klockenbusch, C. & Kast, J. (2010). Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin  $\beta 1$ . *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 927585.

- Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. & Messerschmidt, A. (2004). Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J*, **23**, 1720–1728.
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, **453**, 885–890.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W.-D. (2003). Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes. *EMBO J*, **22**, 6214–6224.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2010). Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci*, **19**, 1137–1161.
- Lee, D., Pervushin, K., Bischof, D., Braun, M. & Thöny-Meyer, L. (2005). Unusual heme-histidine bond in the active site of a chaperone. *J Am Chem Soc*, **127**, 3716–3717.
- Lüer, C., Schauer, S., Möbius, K., Schulze, J., Schubert, W. D., Heinz, D. W., Jahn, D. & Moser, J. (2005). Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J Biol Chem*, **280**, 18568–18572.
- Lewenza, S., Mhlanga, M. M. & Pugsley, A. P. (2008). Novel inner membrane retention signals in *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J Bacteriol*, **190**, 6119–6125.
- Londer, Y. Y. (2011). Expression of recombinant cytochromes *c* in *E. coli*. In: *Heterologous Gene Expression in E. coli*. (Evans, T. C., Xu, M.-Q., Eds.), 123–150. Humana Press, New York City.
- Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2012). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Malashkevich, V. N., Hädener, A., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1996). The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76 Å resolution. *Proteins*, **25**, 48–78.
- Lycklama a Nijeholt, J. A. & Driessen, A. J. M. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **367**, 1016–1028.
- Magnowska, Z. (2010). Membranes provide new insight into the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Doktorarbeit, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig.
- Mann, S. (1966). Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archiv für Mikrobiologie*, **54**, 184–190.
- Matsuyama, S., Tajima, T. & Tokuda, H. (1995). A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J*, **14**, 3365–3372.
- Matsuyama, S., Yokota, N. & Tokuda, H. (1997). A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J*, **16**, 6947–6955.

- Möbius, K. (2008). Electron transport chain coupled protoporphyrinogen IX oxidase from *Escherichia coli*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.
- Möbius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hännig, A.-L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schröder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M. & Jahn, D. (2010). Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 10436–10441.
- McRee, D. E. (1999). *Practical protein crystallography, second edition*. Academic Press, Waltham, Massachusetts.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **64**, 518–523.
- Micklefield, J., Mackman, R. L., Aucken, C. J., Beckmann, M., Block, M. H., Leeper, F. J. & Battersby, A. R. (1993). A novel stereoselective synthesis of the macrocycle of haem  $d_1$  that establishes its absolute configuration as 2*R*,7*R*. *J Chem Soc, Chem Commun*, **1993**, 275.
- Migula, W. (1900). *System der Bakterien, zweite Edition*. Gustav Fischer, Jena.
- Münch, K. (2009). Heterologe Produktion der c-Typ Cytochrome NirN und NirS aus *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* und chromatographische Reinigung. Diplomarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.
- Nagashima, S., Shimada, K., Verméglio, A. & Nagashima, K. V. P. (2011). The cytochrome  $c_8$  involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in *Rubrivivax gelatinosus*. *BBA - Bioenergetics*, **1807**, 189–196.
- Narita, S.-I. & Tokuda, H. (2007). Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J Biol Chem*, **282**, 13372–13378.
- Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1735–1756.
- Nurizzo, D., Silvestrini, M. C., Mathieu, M., Cutruzzolà, F., Bourgeois, D., Fülöp, V., Hajdu, J., Brunori, M., Tegoni, M. & Cambillau, C. (1997). N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*, **5**, 1157–1171.
- Oglesby-Sherrouse, A. G. & Vasil, M. L. (2010). Characterization of a heme-regulated non-coding RNA encoded by the *prfF* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, **5**, e9930.
- Okuda, S. & Tokuda, H. (2011). Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **65**, 239–259.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C. J. & Dalbey, R. E. (2002). Signal peptidases. *Chem Rev*, **102**, 4549–4580.
- Parr, S. R., Barber, D., Greenwood, C., Phillips, B. W. & Mellings, J. (1976). A purification procedure for the soluble cytochrome oxidase and some other respiratory proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J*, **157**, 423–430.

- Pearson, I. V., Page, M. D., van Spanning, R. J. M. & Ferguson, S. J. (2003). A mutant of *Paracoccus denitrificans* with disrupted genes coding for cytochrome  $c_{550}$  and pseudoazurin establishes these two proteins as the *in vivo* electron donors to cytochrome  $cd_1$  nitrite reductase. *J Bacteriol*, **185**, 6308–6315.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, **8**, 785–786.
- Philippot, L. & Højberg, O. (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1446**, 1–23.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, **268**, 1899–1902.
- Randall, L. L., Crane, J. M., Lilly, A. A., Liu, G., Mao, C., Patel, C. N. & Hardy, S. J. S. (2005). Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *J Mol Biol*, **348**, 479–489.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Hardy, S. J., Pavlov, M. Y., Freistroffer, D. V. & Ehrenberg, M. (1997). Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 802–807.
- Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. & Cornelis, P. (2010). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **156**, 2597–2607.
- Rhodes, G. (2006). *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models, third edition*. Academic Press, Waltham.
- Righetti, P. G. (1990). Recent developments in electrophoretic methods. *J Chromatogr*, **516**, 3–22.
- Rinaldo, S., Arcovito, A., Giardina, G., Castiglione, N., Brunori, M. & Cutruzzolà, F. (2008). New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa*  $cd_1$  nitrite reductase. *Biochem Soc Trans*, **36**, 1155–1159.
- Rinaldo, S., Brunori, M. & Cutruzzolà, F. (2007). Nitrite controls the release of nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*  $cd_1$  nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 662–666.
- Rinaldo, S., Giardina, G., Castiglione, N., Stelitano, V. & Cutruzzolà, F. (2011). The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa*  $cd_1$  nitrite reductase. *Biochem Soc Trans*, **39**, 195–200.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual, third edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sankaran, K. & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, **269**, 19701–19706.
- Sawyer, E. B. & Barker, P. D. (2012). Continued surprises in the cytochrome *c* biogenesis story. *Protein Cell*, **3**, 405–409.
- Schalk, I. J. (2008). Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem*, **102**, 1159–1169.

- Schauer, S., Lüer, C. & Moser, J. (2003). Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, **31**, 271–275.
- Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U. & Greaves, M. F. (1982). A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem*, **257**, 10766–9.
- Schnitzer, T. (2011). Produktion und Reinigung der Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas stutzeri* zur Extraktion des Cofaktors Häm *d*<sub>1</sub>. Bachelorarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. & Jahn, D. (2007). The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol*, **189**, 4310–4314.
- Schröter, J. (1872). Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In: *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* (Cohn, F., Ed.), 109–126. J. U. Kern's Verlag, Breslau.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*, **2**, 48–62.
- Schweizer, H. P., Klassen, T. & Hoang, T. T. (1996). Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*. In: *Molecular Biology of Pseudomonads* (Nakazawa, T., K., Furukawa, D. Haas and Silver, S., Ed.), 229–237. ASM Press, Washington, DC.
- Sharma, V., Noriega, C. E. & Rowe, J. J. (2006). Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 695–701.
- Shemin, D., Russel, C. S. & Abramsky, T. (1955). The succinate-glycine cycle I. The mechanism of pyrrole synthesis. *J Biol Chem*, **215**, 613–626.
- Shouldice, S. R., Heras, B., Walden, P. M., Totsika, M., Schembri, M. A. & Martin, J. L. (2011). Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 1729–1760.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, **7**, 539.
- Silva, P. J. & Ramos, M. J. (2008). Comparative density functional study of models for the reaction mechanism of uroporphyrinogen III synthase. *J Phys Chem B*, **112**, 3144–3148.
- Silvestrini, M. C., Cutruzzolà, F., Schininà, M. E., Maras, B., Rolli, G. & Brunori, M. (1996). Isolation and characterization of the *d*<sub>1</sub> domain of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase. *J Inorg Biochem*, **62**, 77–87.
- Silvestrini, M. C., Cutruzzola, F., D'Alessandro, R., Brunori, M., Fochesato, N. & Zennaro, E. (1992). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase in *Pseudomonas putida* and characterization of the recombinant protein. *Biochem J*, **285**, 661–666.
- Simon, J. & Hederstedt, L. (2011). Composition and function of cytochrome *c* biogenesis System II. *FEBS J*, **278**, 4179–4188.

- Sjögren, T. & Hajdu, J. (2001). The Structure of an alternative form of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase. *J Biol Chem*, **276**, 29450–29455.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, **30**, 225–420.
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. & Miller, N. E. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1097–1106.
- Steen, A. (2011). Contribution of the stringent response and ANR to anaerobic survival of Pseudomonads. Doktorarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.
- Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D. & Ferguson, S. J. (2011). Cytochrome *c* biogenesis System I. *FEBS J*, **278**, 4170–4178.
- Storbeck, S., Rolfes, S., Raux-Deery, E., Warren, M. J., Jahn, D. & Layer, G. (2010). A novel pathway for the biosynthesis of heme in *Archaea*: genome-based bioinformatic predictions and experimental evidence. *Archaea*, **2010**, 175050.
- Storbeck, S., Saha, S., Krausze, J., Klink, B. U., Heinz, D. W. & Layer, G. (2011). Crystal structure of the heme *d*<sub>1</sub> biosynthesis enzyme NirE in complex with its substrate reveals new insights into the catalytic mechanism of S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases. *J Biol Chem*, **286**, 26754–26767.
- Storbeck, S., Walther, J., Müller, J., Parmar, V., Schiebel, H. M., Kemken, D., Dülcks, T., Warren, M. J. & Layer, G. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa nirE* gene encodes the S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme *d*<sub>1</sub> biosynthesis. *FEBS J*, **276**, 5973–5982.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959–964.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, **41**, 207–234.
- Suzuki, M., Hirai, T., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of thermophilic cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Biosci Bioeng*, **101**, 391–397.
- Tanaka, S.-Y., Narita, S.-I. & Tokuda, H. (2007). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. *J Biol Chem*, **282**, 13379–13384.
- Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. G. & Moura, I. (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem*, **100**, 2087–2100.
- Thöny-Meyer, L. (2002). Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans*, **30**, 633–638.



- Thöny-Meyer, L. & Künzler, P. (1997). Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome *c* depend on *sec* and *lep*, but not on the *ccm* gene products. *Eur J Biochem*, **246**, 794–799.
- Thoma, S. & Schobert, M. (2009). An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS Microbiol Lett*, **294**, 127–132.
- Timóteo, C. G., Pereira, A. S., Martins, C. E., Naik, S. G., Duarte, A. G., Moura, J. J. G., Tavares, P., Huynh, B. H. & Moura, I. (2011). Low-Spin heme *b*<sub>3</sub> in the catalytic center of nitric oxide reductase from *Pseudomonas nautica*. *Biochemistry*, **50**, 4251–4262.
- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 465–473.
- Tokuda, H. & Matsuyama, S.-I. (2004). Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1693**, 5–13.
- Tokunaga, M., Loranger, J. M. & Wu, H. C. (1984). Prolipoprotein modification and processing enzymes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **259**, 3825–3830.
- Tomkiewicz, D., Nouwen, N., van Leeuwen, R., Tans, S. & Driessen, A. J. M. (2006). SecA supports a constant rate of preprotein translocation. *J Biol Chem*, **281**, 15709–15713.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350–4354.
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K. & Eberl, L. (2012a). Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res*, **11**, 4906–4915.
- Toyofuku, M., Uchiyama, H. & Nomura, N. (2012b). Social behaviours under anaerobic conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol*, **2012**, 405191.
- Van Alst, N. E., Sherrill, L. A., Iglewski, B. H. & Haidaris, C. G. (2009). Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Can J Microbiol*, **55**, 1133–1144.
- van der Wolk, J. P., de Wit, J. G. & Driessen, A. J. (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J*, **16**, 7297–7304.
- Vander Wauven, C., Piérard, A., Kley-Raymann, M. & Haas, D. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol*, **160**, 928–934.
- Vasilescu, J., Guo, X. & Kast, J. (2004). Identification of protein-protein interactions using *in vivo* cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*, **4**, 3845–3854.
- Walther, J. (2011). Biosynthese des Isobakteriochlorins Häm *d*<sub>1</sub>: Charakterisierung der Proteine NirJ und NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa*. Doktorarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.
- Weeg-Aerssens, E., Wu, W. S., Ye, R. W., Tiedje, J. M. & Chang, C. K. (1991). Purification of cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic heme *d*<sub>1</sub>. *J Biol Chem*, **266**, 7496–7502.

- Whitby, F. G., Phillips, J. D., Kushner, J. P. & Hill, C. P. (1998). Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J*, **17**, 2463–2471.
- Williams, H. D., Zlosnik, J. E. A. & Ryall, B. (2007). Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol*, **52**, 1–71.
- Williams, P. A., Fülöp, V., Garman, E. F., Saunders, N. F., Ferguson, S. J. & Hajdu, J. (1997). Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature*, **389**, 406–412.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2011). Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res*, **39**, D596–D600.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2009). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res*, **37**, D483–D488.
- Xiong, J., Bauer, C. E. & Pancholy, A. (2007). Insight into the haem *d*<sub>1</sub> biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology*, **153**, 3548–3562.
- Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. & Tokuda, H. (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol*, **2**, 212–218.
- Yamada, H., Matsuyama, S., Tokuda, H. & Mizushima, S. (1989). A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J Biol Chem*, **264**, 18577–18581.
- Yamaguchi, K., Yu, F. & Inouye, M. (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell*, **53**, 423–432.
- Zajicek, R. S., Bali, S., Arnold, S., Brindley, A. A., Warren, M. J. & Ferguson, S. J. (2009). *d*<sub>1</sub> haem biogenesis - assessing the roles of three *nir* gene products. *FEBS J*, **276**, 6399–6411.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 533–616.
- Zumft, W. G., Döhler, K., Körner, H., Löchelt, S., Viebrock, A. & Frunzke, K. (1988). Defects in cytochrome *cd*<sub>1</sub>-dependent nitrite respiration of transposon Tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol*, **149**, 492–498.
- Zumft, W. G. & Kroneck, P. M. H. (2007). Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol*, **52**, 107–227.

# A Anhang

## 1 - Prozessierte Aminosäuresequenzen ohne Signalsequenzen

### a - NirS

542 AS - KDDMKAAEQYQGAASAVDPAHVVRTNGAPDMSESEFNEAKQIYFQRCAGCHGVLKRGATGKPLTPDI  
TQQRGQQYLEALITYGTPLGMPNWGSSGELSKEQITLMAKYIQHTPPQPPEWGMPEMRESWKVLVKPEDRPPKQLNDL  
DLPNLFSVTLRDAGQIALVDGDSKKIVKVIDTGYAVHISRMSASGRYLLVIGRDARIDMIDLWAKEPTKVAEIKIGIE  
ARSVESSKFKGYEDRYTIAGAYWPPQFAIMDGETLEPKQIVSTRGMTVDTQTYHPEPRVAIIASHEHPEFIVNVKET  
GKVLLVNYKDIDNLTVTSIGAAPFLHDGGWDSSHRYFMTAANNSNKVAVIDSKDRRLSALVDVGKTPHPGRGANFVHP  
KYGPVWSTSHLGDGSLIGTDPKNHPQYAWKKVAELQGQGGGSLFIKTHPKSSHYVDTTFNPDARISQSVAVFDLK  
NLDAKYQVLPPIAEWADLGEGAKRVVQPEYNKRGDEVWFSVWNGKNDSSALVVDDKTLKLKAVVKDPRLITPTGKFNV  
YNTQHDVY

### b - NirN

475 AS - GEAPGEALYRQHCQACHGAGRLGGSGPTLLPESLSRLKPAQAREVILHGRPATQMAGFAGQLDDAAA  
DALVAYLYQAPPREPQWSAEDIRASVQVPHPLATLPSRPRFEADPLNLFVVVESGDHHTILDGDRFEPARFPSRYA  
LHGGPKFSPDGRVLVYFASRDGWVTLYDLYNLKVVAEVRAGLNTRNLAVSDDGRWVLVGNYPGNLVLLDARDLSLVQV  
IPAADAQQASRVSAVYTAPPRHSFVVALKDVHELWELPYANGKPVAPKRLAVADYLDDFSFPDYRYLLGSSRQARG  
GEVIELDSGARVASIPLSGMPHLGSGIYWKRDGRWVFATPNISRGVISVIDLQNWKPLKEIVTDGPGFFMRSHADSPY  
AWTDTFLGKKHDEILLIDKQTLEIAHRLRSPGKVAGHVEFTRDGRYALLSVWDRDGALVVYDAHSLEEVKRLPMNKP  
SGKYNVGNKIGYAEGTSH

### c - NirF

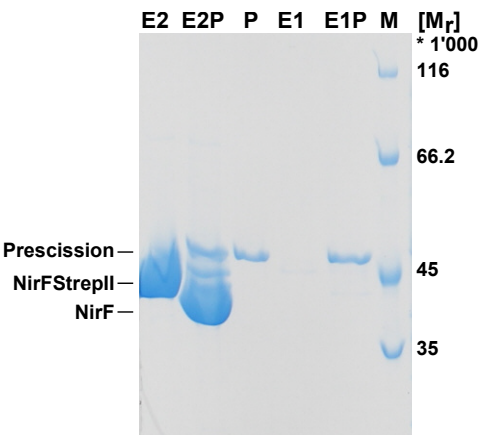
376 AS - CSQQPPLRGSGDLGVLIERADGSVQILDGTAKTSLARVEGLGDLSHASLVFSRDQRYAYVFGRDGGL  
TKLDLLAQRIDKRLIQGGNSIGGAISQDGRLVAVSNYEPGGVKVFDSTLELVAEIPATRLPGQDRNSRVVGLVDAPG  
QRFVFSLFDSGEIWIADFSQGDTPHLTRFRDIGKQPYDALISPDGRYYMAGLFGEDGMAQLDLWHPERGVRRLVDYD  
RGQRKLPVYKMPHLEGWTIASDQAFVPAVGHHQVLVLDARDWKQTDIDAIDVAGQPVFVMTRPDDRQIWNFAYPDNDKV  
QVIDSETHEVIETLRPGPVLHMEFSGRGDQVWISVRDADQLQVWDPYRLKRIGSLPARSPSGIFFSHRAQHIGL

## 2 - NirF-Konstrukte und NirF<sub>D.s.</sub>-Umsatz mit Prescission-Protease

Die Tabelle A.1 gibt die verschiedenen getesteten NirF-Varianten an. Abkürzungen richten sich dabei nach folgender Legende: codon - *codon usage* für *E. coli* adaptiert; Signal. - Signalsequenz; Tag N - N-terminaler Tag; Tag C - C-terminaler Tag; Prod. - Produktion; Lösl. - Löslichkeit; „+“ - ja; „-“ - nein; „?“ - nicht getestet/nicht nachweisbar.

Tabelle A.1: NirF-Konstrukte

Plasmid	nirF	codon	Signal.	Tag N	Tag C	Prod.	Lösl.	Reinigung
pET22b	P.a.	-	PelB	-	OneSTrEP	+	-	+ GroEL
pET22b	P.a.	-	PelB	-	-	+	?	?
pET22b	P.a.	-	DsbA	-	OneSTrEP	+	-	+ GroEL
pET22b	P.a.	-	DsbA	-	-	?	?	?
pETDuet	D.s.	-	nativ	-	-	+	?	?
pET52b	D.s.	+	cyt.	-	His <sub>6</sub>	-	-	-
pETDuet	D.s.	+	PelB	His <sub>6</sub>	-	+	+	-
pET22b	D.s.	+	PelB	-	His <sub>6</sub>	+	?	?
pETDuet	D.s.	+	PelB	-	His <sub>6</sub>	+	?	?
pET22b	D.s.	+	DsbA	His <sub>6</sub>	-	+	+	-
pETDuet	D.s.	+	DsbA	-	His <sub>6</sub>	+	+	?
pET22b	D.s.	+	DsbA	StrepII	-	+	?	?
pET22b	D.s.	+	PelB	-	StrepII	+	+	+



**Abbildung A.1: Proteolytischer Verdau von NirF<sub>D.s.</sub>StrepII mit Prescission Protease.** Diese Abbildung zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der Proteinlösungen von zwei Elutionsfraktionen von NirF<sub>D.s.</sub> nach zweistündiger Inkubation mit Prescission-Protease bei RT, analog zu 2.7.7.5. **Spur E2:** Proteine der Elutionsfraktion 2. **Spur E2P:** Proteine der Elutionsfraktion 2 nach Inkubation mit Prescission. **Spur P:** Vergleichsprobe Prescission. **Spur E1:** Proteine der Elutionsfraktion 1. **Spur E1P:** Proteine der Elutionsfraktion 1 nach Inkubation mit Prescission. **Spur M:** Proteingrößenstandard, die relativen Molekularmassen [M<sub>r</sub>] sind angegeben (\* 1'000). Die Proteine sind entsprechend im Bild gekennzeichnet.

### 3 - Polyklonale Antikörper

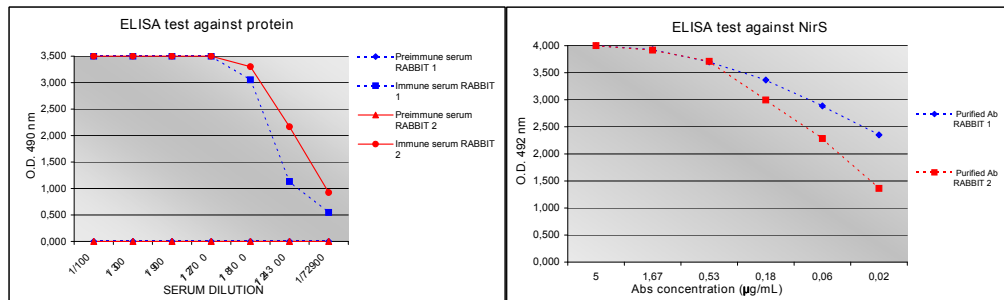
#### ELISA-Daten pAKs gegen NirS

Polyclonal Ab against NirS  
Code ZCA/11

SERUM DILUTION	Preimmune serum RABBIT 1	Immune serum RABBIT 1	Preimmune serum RABBIT 2	Immune serum RABBIT 2
1/100	0,000	3,500	0,000	3,500
1/300	0,000	3,500	0,000	3,500
1/900	0,000	3,500	0,000	3,500
1/2700	0,000	3,500	0,000	3,500
1/8100	0,000	3,053	0,000	3,301
1/24300	0,000	1,132	0,000	2,166
1/72900	0,000	0,548	0,000	0,924

Purified Polyclonal Ab against NirS  
Code ZCA/11

Abs concentration (µg/mL)	Purified Ab RABBIT 1	Purified Ab RABBIT 2
5	4,000	4,000
1,67	3,928	3,918
0,53	3,700	3,711
0,18	3,365	2,997
0,06	2,887	2,285
0,02	2,351	1,361



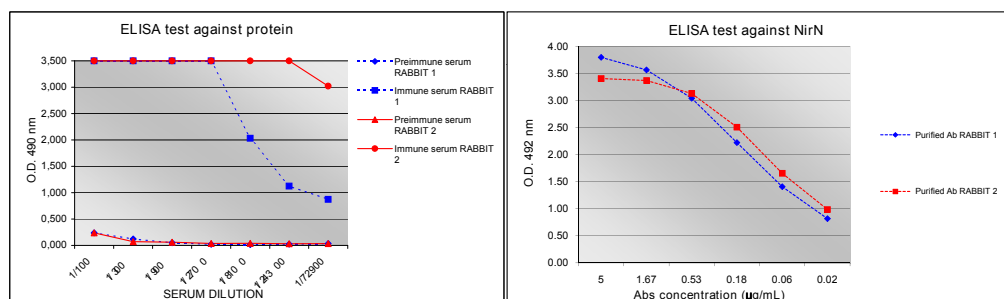
#### ELISA-Daten pAKs gegen NirN

Polyclonal Ab against NirN  
Code ADA/11

SERUM DILUTION	Preimmune serum RABBIT 1	Immune serum RABBIT 1	Preimmune serum RABBIT 2	Immune serum RABBIT 2
1/100	0,239	3,500	0,237	3,500
1/300	0,121	3,500	0,072	3,500
1/900	0,051	3,500	0,052	3,500
1/2700	0,020	3,500	0,038	3,500
1/8100	0,016	2,033	0,039	3,500
1/24300	0,025	1,126	0,033	3,500
1/72900	0,035	0,874	0,034	3,021

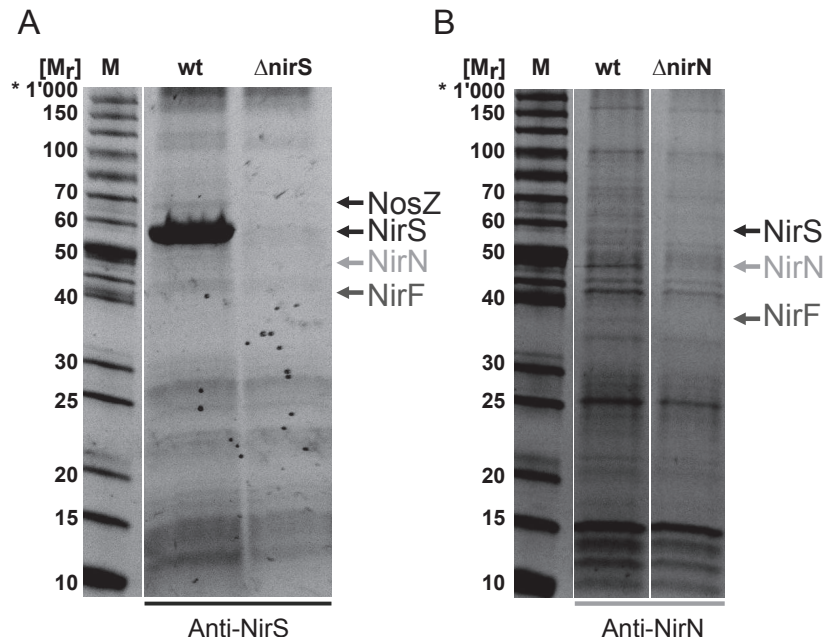
Purified Polyclonal Ab against NirN  
Code ADA/11

Abs concentration (µg/mL)	Purified Ab RABBIT 1	Purified Ab RABBIT 2
5	3,80	3,41
1,67	3,57	3,37
0,53	3,04	3,13
0,18	2,22	2,51
0,06	1,41	1,66
0,02	0,82	0,99



**Abbildung A.2: ELISA-Ergebnisse der von Metabion erzeugten polyklonalen Antikörper gegen NirS und NirN.** Die Abbildung zeigt die von Metabion durchgeführten ELISA-Messungen zu den polyklonalen Antikörpern gegen NirS (oben) und gegen NirN (unten). Dabei sind links die Werte der Kaninchen-Seren vor und nach der Immunisierung zu finden. Rechts sind die Daten der gereinigten Antikörper gezeigt. (pers. Mitteilung der Firma Metabion).

## 4 - Kontrollen der Immunoaffinitätschromatographie von NirS und NirN



**Abbildung A.3: Gegenüberstellung der Immunoaffinitätschromatographien von NirS und NirN mit deren Kontrollen.** Die Proben wurden wie in Kapitel 2.11.3 beschrieben erzeugt. A zeigt dabei die Reinigungen von nativer NirS aus *P. aeruginosa* PAO1 wt und der  $\Delta nirS$ -Mutante nach *in vivo* Protein-cross-linking (IVPCL) unter der Nutzung von  $\alpha NirS$ . B stellt das Ergebnis der Immunoaffinitätsreinigung von nativer NirN aus *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta nirN$  und dem wt nach IVPCL dar. Die eluierten Proben wurden jeweils mittels SDS-PAGE-Analyse (2.8.2) untersucht und die markierten Banden aus den wt-Proben zur massenspektrometrischen Untersuchung ausgeschnitten. Für die Experimente in A und B wurden gleiche Mengen an *P. aeruginosa*-Zellen verwendet.

## 5 - Massenspektrometrische Daten

### Anhang 5 zu Abb. 3.23 A

Periplasmatisch (P), Membranprotein der inneren oder äußeren Membran (IM/OM)

and outer membrane vesicle proteins (OMV) from *P. aeruginosa* PAO1

Lokalisierungen nach [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) oder SignalP 3.0

Trypsin Verdau

Peptidmassentoleranz:  $\pm 20$  ppm

Fragmentmassentoleranz:  $\pm 0.3$  Da

Signifikanz  $p < 0.05$

Zehn ersten Resultate oder Wertung von  $>45$

Bande: NosZ			Bande rel. Größe:		ca. 70'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15595716 PA0519	NirS		62614	536	19	P
15598588 PA3392	NosZ		70615	150	7	P
15597002 PA1805	PpiD		68699	148	7	IM
15599791 PA4595	ABC-Transporter ATP Bindung		61283	106	4	P
15597007 PA1810	ABC-Transporter Komponente		70429	96	4	P
15599939 PA4745	NusA		54626	95	4	P
15596780 PA1583	SdhA		63492	76	2	P
15595785 PA0588	hypothetisches Protein		73676	76	3	OMVesicle
15595715 PA0518	NirM		10960	66	1	P
15600230 PA5037	hypothetisches Protein		57412	61	2	IM

Bande: NirS			Bande rel. Größe:		ca. 60'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15595716 PA0519	NirS		62614	7843	35	P
15599581 PA4358	GroEL		57050	685	15	P / OMVes.
15599698 PA4502	ABC-Transporter Komponente		58575	132	4	P
15599687 PA4491	hypothetisches Protein		64175	78	3	OMVesicle
15596997 PA1800	Tig		48552	66	2	P
15596580 PA1383	hypothetisches Protein		63104	65	2	P
15597001 PA1804	HupB		9081	57	2	OMVesicle
15598994 PA3799	EngA		54972	57	3	IM
15598588 PA3392	NosZ		70615	54	2	P
15600244 PA5051	ArgS		65158	53	2	P

Bande: NirN			Bande rel. Größe:		ca. 50'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15595716 PA0519	NirS		62614	411	10	P
15596997 PA1800	Tig		48552	224	9	P
15597001 PA1804	HupB		9081	218	4	OMVesicle
15598941 PA3746	Ffh		49328	161	3	IM
15595706 PA0509	NirN		53945	99	2	P
15600432 PA5239	Rho		47154	93	4	P
15596352 PA1155	NrdB		47356	76	3	P
15599026 PA3831	PepA		52299	61	2	OMVesicle
15596202 PA1005	hypothetisches Protein		52961	60	2	P
15598197 PA3001	Glycerald.-3-phosph. dehyd.		50080	60	2	P

Bande: NirF			Bande rel. Größe:		ca. 40'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15595716	PA0519	NirS	62614	863	17	P
15595791	PA0594	SurA	48443	220	9	P
15596169	PA0972	TolB	47722	219	7	P
15600135	PA4942	HflK	44018	203	4	OMVesicle
15596271	PA1074	BraC	39744	192	5	P
15598813	PA3617	RecA	36856	185	4	C / P / OMV
15600451	PA5258	hypothetisches Protein	40767	170	6	IM
15595713	PA0516	NirF	43311	170	6	P
15596785	PA1588	SucC	41517	111	4	P
15598355	PA3159	WbpA	48125	106	3	P / OMV

### Anhang 5 zu Abb. 3.23 B

Periplasmatisch (P), Membranprotein der inneren oder äußeren Membran (IM/OM)

and outer membrane vesicle proteins (OMV) from *P. aeruginosa* PAO1

Lokalisierungen nach [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) oder SignalP 3.0

Trypsin Verdau

Peptidmassentoleranz:  $\pm 20$  ppm

Signifikanz  $p < 0.05$

Fragmentmassentoleranz:  $\pm 0.3$  Da

Zehn ersten Resultate oder Wertung von  $>45$

Bande: NirS			Bande rel. Größe:		ca. 60'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15599581	PA4358	GroEL	57050	731	15	P / OMVes.
15595716	PA0519	NirS	62614	522	12	P
15599525	PA4329	PykA	52220	339	8	P
15598172	PA2976	Rne	117395	276	8	OMVes.
15599069	PA3874	NarH	58068	264	7	OMVes.
15600271	PA5078	Glucon biosynth. Protein G	59439	212	7	P
15596997	PA1800	Tig	48552	151	4	P
15600749	PA5556	AtpA	55359	136	4	P
15597035	PA1838	CysI	62094	122	3	P
15598358	PA3162	RpsA	61832	111	2	P / OMVes.

Bande: NirN			Bande rel. Größe:		ca. 50'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15600432	PA5239	Rho	47040	525	14	P / IM
15595706	PA0509	NirN	53945	383	9	P
15596997	PA1800	Tig	48552	352	10	P
15596352	PA1155	NrdB	47356	213	4	P
15599581	PA4358	GroEL	57050	201	4	P / OMVes.
15598197	PA3001	Glyceraldehy.-3-phosph DH	50080	199	5	P / OMVes.
15596291	PA1094	FliD	49420	196	6	P / OMVes.
15600747	PA5554	AtpD	49469	188	5	P / OMVes.
15598172	PA2976	Rne	117395	170	5	OMVes.
15600189	PA4669	RfaE	50318	162	5	P

Bande: NirF			Bande rel. Größe:		ca. 38'000	
gi	Gen	Protein	Masse	Wertung	Sequenzen	Lokalisierung
15596534	PA1337	AnsB	38620	195	7	P
15600425	PA5232	hypothetisches Protein	38549	135	3	OMVesicle
15598363	PA3167	SerC	39924	120	2	P
15597638	PA2442	GcvT2	39857	85	3	P
15595497	PA0300	SpuD	40604	83	2	P
15599581	PA4358	GroEL	57050	72	2	P / OMVes.
15597936	PA2740	PheS	38039	70	2	P
15600035	PA4842	hypothetisches Protein	39964	65	1	OMVesicle
15598734	PA3538	ABC-Transporter Komponente	39166	61	2	IM
15595713	PA0516	NirF	43311	60	2	P



## B Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Gunhild Layer für die Möglichkeit bei ihr diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für Motivation und Unterstützung sowie die unzähligen Erfahrungen, die ich in den letzten dreieinhalb Jahren sammeln durfte. Seien es Fachkonferenzen im In- und Ausland, Vorträge, Poster oder Paper. Ich durfte so viel Unterschiedliches kennenlernen, das meinen Horizont unglaublich erweitert hat. All dieses half mir mich persönlich und fachlich weiterzuentwickeln.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich in aller Form für die Übernahme des Zweitgutachtens und dafür bedanken, dass die Förderung durch den Braunschweiger Hochschulbund zu Stande kam. Darüber hinaus danke ich ihnen für den damaligen Tipp bezüglich der Immunopräzipitationsexperimente und für den Aufbau dieses Instituts, das ich aufgrund der Mitarbeiter und der Möglichkeiten unheimlich zu schätzen weiß.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission. Weiterhin gilt Ihnen mein Dank, da sie mit PROTRAIN eine so bereichernde Forschungsgruppe aufgebaut haben.

Dem gesamten Institut gilt mein Dank für die tolle Arbeitszeit. Besonders möchte ich mich bei Bernd Hoppe, Christina Nitzsche und Daniela Schnobel bedanken. Danke, dass ich Südkorea nicht selbst bezahlen musste. Barbara Cwiklinski und Dagmar Rose, vielen Dank für Eure Hilfe. Danke auch an Dr. Martina Jahn für Hilfe in besonderen Lebenslagen.

An dieser Stelle sei Dr. Jürgen Moser und seiner Arbeitsgruppe für die lehrreichen Seminare mit allem, was dazu gehörte, gedankt.

Den folgenden Kooperationspartnern sei gedankt: Dr. Stefan Schmelz, Sayantan Saha, Dr. Manfred Nimtz, Prof. Dr. Lothar Jänsch, Prof. Dr. Kathrin Riedel, Dr. Martin Kucklick, Undine Felgenträger, Beate Jaschock-Kentner vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung; Prof. Dr. Brigitte Jockusch, Dr. Thorben Dammeyer, Prof. Dr. Philip Tinnefeld, Dr. Bohdan Snovy-dovych, Prof. Dr. Thomas Lindel von der TU Braunschweig.

An dieser Stelle sei allen PROTRAIN-Mitstreitern für tolle Diskussionen, Seminare und Workshops gedankt und für alles was wir sonst noch erlebt haben. Außerdem danke ich Angela Kusserow für die Unterstützung bei der Dienstreiseorganisation.

Sabine Buchmeier möchte ich an dieser Stelle explizit meinen Dank aussprechen. Du hast mich tief beeindruckt und es war mir eine absolute Freude mit dir arbeiten zu dürfen.

Weiterhin gilt mein Dank den Jungs und Mädels, die die Doktorandeninitiative auf ihren Schultern tragen und trugen: Melanie, Jens, Sebastian, Knuuti und Janine. Super Melanie, dass du es damals durchziehen wolltest. Und an die Aktuellen: „Immer weiter machen!“

Dem Labor der AG Layer danke ich besonders. Unzählige tolle Stunden durfte ich mit Euch erleben. Judith, Hannes, Sonja, Melanie, Kristin, Katja und Julia, ich danke Euch! Dazu gehören natürlich auch fast alle Bachelor, Master und Praktikanten, die in meiner Zeit bei uns vorbeigeschaut haben, insbesondere die, die unter mir schufteten durften.

Besonders bedanken muss ich mich bei den Menschen, die diese Arbeit lesen durften/ mussten. Anne, Kristin, Conny, Katja, Christiane, Knuuti und Julia. Entschuldigt bitte.

Einigen Mitstreitern und Freunden möchte ich auf diesem Wege auch noch einmal besonders Danke sagen: Die Pokerrunde - War schon irgendwie lustig. Wiebke - Darum. Hannes, Knuuti, Sebastian sowie Simon - Für die Männer. Conny - Babbel nicht so rum. Christiane - Nicht zu lieb sein. Elena und Rebi - Echte Liebe und so. Tobi - Danke für gutes Essen und lass dich nicht von Kristin und Melanie ärgern. Kristin und Melanie - ärgert den Tobi mal ein bisschen. Julia - vielen Dank für die gemeinsamen Monate auf dem Projekt. Viel Glück und Erfolg in der Zukunft. Judith, Sonja, Andrea und Frederike - Und alle seid ihr schon vergeben. Phillip - Auf ein kühles Blondes.

Anne, Theo, Lena und Gordon. Ich bin immer noch so dankbar, die Zeit mit Euch in Dresden gehabt zu haben und dass ihr euch auch heute noch mit mir abgebt. Wir haben's bald!

Zuletzt die wichtigsten Personen: Axel, Iris, Lennart und Oma. Es gilt nach wie vor, was in meiner Diplomarbeit stand. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke! Der Schmidt-Familie möchte ich an dieser Stelle auch danken, vor allem für eure Tochter. Und damit bin ich bei dir Julia. Danke für die letzten zehn Jahre, deine Unterstützung und Liebe und für alles was da zukünftig noch kommen mag.